

质谱技术快速鉴定临床分离丝状真菌的应用

曹敬荣 王岩 谢威 李文军 陈典典 段园园 刘云屹 闵嵘 王培昌

【摘要】目的 探讨质谱(MALDI-TOF MS)在临床分离的丝状真菌快速鉴定中的应用。**方法** 收集首都医科大学宣武医院2017年1月至2019年1月经形态学鉴定为丝状真菌的菌株,分别采用双甲酸夹心法和甲酸乙腈萃取法提取真菌蛋白并行MALDI-TOF MS鉴定,并与聚合酶链反应(PCR)内转录间隔区(ITS)基因序列测定结果比较;分析丝状真菌菌种分布和标本来源。**结果** 共收集临床分离的丝状真菌90株,其中曲霉属70株(77.78%),青霉菌属6株(6.67%),链格孢属5株(5.56%),镰刀菌属4株(4.44%),赛多孢属2株(2.22%),米根霉、根毛霉和哈茨木霉各1株(1.11%);其中曲霉菌以烟曲霉47株(52.22%)、黄曲霉13株(14.44%)和黑曲霉4株(4.44%)为主。标本主要来源于呼吸道标本(90.0%) (包括痰标本和肺泡灌洗液),其次为角膜和耳道分泌物(3.33%),痰标本中分离率最多的为曲霉菌(59株、65.56%)。MALDI-TOF MS鉴定到种水平82株,与基因测序结果一致率为91.11%(82/90),鉴定准确率显著高于形态学鉴定结果(68.89%, 62/90),差异有统计学意义($\chi^2 = 12.02, P = 0.01$);质谱鉴定丝状真菌中的曲霉菌、镰刀菌、赛多孢菌和链格孢霉时准确率高(98.57%~100%);双甲酸夹心法和甲酸乙腈萃取法前处理的质谱鉴定丝状真菌到种水平的比率分别为91.11%(82/90)和90.00%(81/90),鉴定曲霉菌种水平分别为98.57%(69/70)和97.14%(68/70),但鉴定准确率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.34, P = 0.95$);两种前处理方法均可100%鉴定烟曲霉、黄曲霉、赛多孢菌和链格孢霉到种水平,其中89.36%(42/47)烟曲霉和76.92%(10/13)黄曲霉鉴定得分 ≥ 2.0 分。**结论** MALDI-TOF MS技术鉴定丝状真菌快速准确,双甲酸夹心法前处理操作更简便,适合实验室常规检测,可用于实验室常规鉴定曲霉菌等常见丝状真菌。

【关键词】 丝状真菌;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;鉴定;双甲酸夹心;甲酸乙腈萃取

Application value of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in rapid identification of clinical filamentous fungi Cao Jingrong, Wang Yan, Xie Wei, Li Wenjun, Chen Diandian, Liu Yunyi, Min Rong, Wang Peichang. Department of Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China

Corresponding author: Wang Peichang, Email: pcw1905@126.com

【Abstract】Objective To investigate the application value of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in rapid identification of clinical filamentous fungi. **Methods** The strains identified as *filamentous fungi* by morphology from January 2017 to January 2019 in Xuanwu Hospital of Capital Medical University were collected and identified by MALDI-TOF MS with the method of double formic acid sandwich and formic acid acetonitrile extraction. The results were compared with the results of its gene sequencing of polymerase chain reaction (PCR) in internal transcribed spacer (ITS). The distribution and source of filamentous *fungi* were analyzed. **Results** A total of 90 clinical isolates of filamentous fungi were collected, including 70 strains of *Aspergillus spp.* (77.78%), 6 strains of *Penicillium spp.* (6.67%), 5 strains of *Alternaria* (5.56%), 4 strains of *Fusarium spp.* (4.44%), 2 strains of *Sedospirium spp.* (2.22%), 1 strain each of *Rhizopus*, *Mucor* and *Trichoderma harzianum* (1.11%). *Aspergillus fumigatus* (47 strains, 52.22%), *Aspergillus flavus* (13 strains, 14.44%) and *Aspergillus niger* (4 strains, 4.44%) were the main isolates. The specimens were mainly from respiratory tract (90.0%) (including sputum and alveolar lavage fluid), followed by cornea and ear canal secretion (3.33%), of which *Aspergillus spp.* were the mainly strains isolated from sputum samples (59 strains, 65.56%). Compared with the results of gene sequencing,

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2020.05.004

基金项目:北京市医管局人才培养计划“登峰”项目(No.DFL20180803);宣武医院院级课题(No.XWJL-2019031)

作者单位:100053 北京,首都医科大学宣武医院检验科

通信作者:王培昌, Email: pcw1905@126.com

the accuracy of MALDI-TOF MS was significantly higher than that of morphology (91.11% vs. 68.89%; $\chi^2 = 12.02$, $P = 0.01$). MALDI-TOF MS was used to identify *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Sedospirium spp.* and *Alternaria* with high accuracy (98.57%-100%). The identification rates of *filamentous fungi* to species level were 91.11% (82/90) and 90% (81/90) by MALDI-TOF MS pretreated with dicarboxylic acid sandwich method and formic acid acetonitrile extraction method, and the identification rates of *aspergillus* species were 98.57% (69/70) and 97.14% (68/70), respectively. There was no significant difference in the identification accuracy of the two pretreatment methods ($\chi^2 = 0.34$, $P = 0.95$). Both pretreatment methods could identify 100% *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus aflatus*, *Sedospirium* and *Alternaria spp.* Among them, 89.36% (42/47) *Aspergillus fumigatus* and 76.92% (10/13) *Aspergillus flavus* scored ≥ 2.0 . **Conclusions** The MALDI-TOF MS technique was rapid and accurate in the identification of *filamentous fungi*, and the double formic acid sandwich pretreatment method was more convenient and suitable for routine laboratory detection. It could be used for routine laboratory identification of common filamentous *fungi* such as *Aspergillus*.

【Key words】 *Filamentous fungi*; Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; Identification; Double formic acid sandwich; Acetonitrile formate extraction

近年来,随着器官移植、免疫抑制剂的广泛应用,丝状真菌引起的侵袭性感染的发病率和病死率亦有增高趋势^[1-3]。虽然曲霉菌属(尤其烟曲霉)仍是侵袭性丝状真菌感染最常见的病原菌^[4-6],但非烟曲霉及非曲霉丝状真菌的分离率逐渐升高。由于不同丝状真菌的药物敏感性存在差异^[5],临床选择抗菌药物不同,因此,快速准确地将丝状真菌鉴定到种水平对提高抗真菌疗效至关重要。目前大多微生物实验室鉴定丝状真菌仍采用传统的形态学方法^[7-8],但对无典型特征的菌株鉴定困难且耗时长,不利于实施快速精准治疗;聚合酶链式反应(PCR)序列分析方法鉴定准确率高,但检测成本高、周期长、需要分子扩增实验室,不能常规开展检测;而基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)已被多项研究^[9-11]报道用于细菌和念珠菌的鉴定,操作简单、快速准确,已较好地应用于临床标本中微生物的鉴定,国内外学者亦有应用质谱技术鉴定丝状真菌的报道^[12-17]。本研究采用两种不同的前处理方法提取丝状真菌蛋白进行质谱鉴定,并将鉴定结果与形态学和测序结果比较,探讨MALDI-TOF MS技术对临床标本分离的丝状真菌的快速鉴定价值,现报道如下。

材料与方法

一、菌株来源

收集首都医科大学宣武医院2017年1月至2019年1月临床送检的各类标本中经形态学初步鉴定为丝状真菌的菌株为研究对象。本研究为回顾性研

究,在患者管理方面无任何修改,研究用菌株均为临床检验后留存菌,所有个人信息均于数据库中加密,患者基本资料被去除标识,无侵犯隐私。

二、仪器与试剂

MALDI Biotyper 3.1全自动快速质谱微生物检测系统及配套的甲酸、乙腈、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)和靶板为德国布鲁克公司,ABI600PCR仪为美国AB公司,凝胶成像仪为美国Bio-Rad公司;沙保弱琼脂平板、血平板来自美国赛默飞公司,DNA提取试剂盒和破壁酶为北京天根生化科技有限公司, Premix Ex Taq酶体系为日本TaKaRa公司。引物合成与PCR产物测序由上海生工公司完成。

三、菌种分离培养及形态学鉴定

按检验项目临床标本直接接种于沙保弱平板(SDA),组织标本研磨成匀浆后接种于SDA,置28℃孵箱培养;血培养标本报警阳性后涂片镜检同时转种SDA,置28℃和35℃培养,丝状真菌生长时观察菌落形态、颜色等特点,乳酸酚棉蓝染色镜下观察菌丝、孢子和分生孢子形态等,初步鉴定丝状真菌菌属。

四、MALDI-TOF MS鉴定

1. 前处理:两种方法:双甲酸夹心^[18]操作,即靶板上加1 μ l甲酸,用无菌枪头取丝状真菌菌丝与甲酸混匀,自然干燥后再覆盖1 μ l甲酸,自然干燥后添加1 μ l基质,进行质谱检测。

甲酸乙腈萃取法提取丝状真菌蛋白按质谱操作SOP文件步骤进行,取1 μ l真菌蛋白点靶,自然干燥后覆盖基质1 μ l,自然干燥后进行质谱鉴定。

2. 鉴定评分:每株菌点靶两次进行鉴定,记录

结果一致时的菌名和鉴定得分^[19]，将鉴定标准定为鉴定到种水平得分 ≥ 1.7 分或低于1.7分但所有鉴定结果为同一种菌；鉴定得分1.5~1.7分为属水平，低于1.5分或鉴定结果为多种菌为无鉴定结果。

五、PCR扩增ITS及序列测定

质谱鉴定结果与形态学不一致时或仅鉴定到属时，进行PCR测序确定最终鉴定结果。按试剂盒说明提取真菌DNA，于 -20°C 保存备用。采用真菌通用引物扩增真菌内转录间隔区(ITS)：ITS1(正向)：5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'和ITS4(反向)：5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'^[20]，扩增结束后取PCR产物5 μl ，1.5%琼脂糖凝胶电泳观察目的片段，进行核酸序列测定，测序结果与GenBank数据库序列进行比对以鉴定丝状真菌。

六、统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。患者的年龄等为计量资料且呈正态分布，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用成组设计资料 t 检验；检出率、符合率等为计数资料，采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、丝状真菌菌种分布与标本来源

收集临床标本分离的丝状真菌共90株，其中曲霉菌属70株(77.78%)，主要为烟曲霉复合体47株(52.22%)、黄曲霉13株(14.44%)、黑曲霉4株(4.44%)、构巢曲霉2株(2.22%)、聚多曲霉/杂色曲霉/米曲霉/土曲霉各1株(1.11%)；青霉菌属6株(6.67%)，包括绳状青霉、橘青霉和

草酸青霉各2株；互隔链格孢霉5株(5.56%)；镰刀菌属4株(4.44%)，包括串珠镰刀菌2株、轮状镰刀菌和层生镰刀菌各1株；尖端赛多孢菌2株；米根霉、根毛霉和哈茨木霉各1株。

标本主要来源于呼吸道标本80株(88.89%)，包括痰标本和肺泡灌洗液，其次为角膜和耳道分泌物标本。痰标本中分离率最多的为曲霉菌59株(65.56%)，其次为青霉菌属(6.67%)；链格孢霉在痰和角膜分泌物中均有分离，镰刀菌属可见于多种标本，丝状真菌菌种分布和标本来源见表1。

二、形态学鉴定结果

所有丝状真菌分别采用形态学方法鉴定，其中鉴定到丝状真菌到种水平者占68.89%(62/90)，鉴定到属水平者占31.11%(28/90)。形态学在曲霉菌中的烟曲霉、黄曲霉等常见真菌可鉴定到种水平，而少见曲霉(杂色曲霉和聚多曲霉)、毛霉、根霉、青霉菌属、镰刀菌属以及赛多孢菌属等时仅鉴定到属水平。

三、MALDI-TOF MS和PCR方法鉴定结果

质谱鉴定丝状真菌到种水平者占91.11%(82/90)，显著高于与形态学鉴定结果的68.89%($\chi^2 = 12.02$ 、 $P = 0.01$)。7株(7.78%)鉴定到属水平，主要为青霉菌属4株、毛霉、根霉和其他曲霉各1株；1株木霉质谱未给出鉴定结果。MALDI-TOF MS鉴定丝状真菌中的曲霉菌(烟曲霉、黄曲霉和黑曲霉等)到种水平为98.57%(69/70)，与PCR测序方法符合率100%；鉴定镰刀菌、赛多孢菌和链格孢霉时，与测序方法结果相比符合率高(100%)，鉴定青霉菌、毛霉和根霉仅到属水平，结果见表2。PCR方法除1例米曲霉不能较好与

表1 90株丝状真菌的菌种分布和标本来源[株(%)]

标本来源	株(%)	曲霉菌属					青霉菌属	链格孢霉	镰刀菌属	赛多孢菌	毛霉
		烟曲霉	黄曲霉	黑曲霉	构巢曲霉	其他曲霉					
痰液	71 (78.89)	41 (45.55)	10 (11.11)	2 (2.22)	2 (2.22)	4 (4.44)	6 (6.67)	2 (2.22)	0 (0.00)	2 (2.22)	1 (1.11)
肺泡灌洗液	9 (10.00)	6 (6.67)	1 (1.11)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.11)	0 (0.00)	1 (1.11)
角膜分泌物	4 (4.44)	0 (0.00)	1 (1.11)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (2.22)	1 (1.11)	0 (0.00)	0 (0.00)
耳道分泌物	3 (3.33)	0 (0.00)	1 (1.11)	2 (2.22)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
伤口分泌物	2 (2.22)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.11)	1 (1.11)	0 (0.00)	0 (0.00)
血液	1 (1.11)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.11)	0 (0.00)	0 (0.00)
合计	90 (100.00)	47 (52.22)	13 (14.44)	4 (4.44)	2 (2.22)	4 (4.44)	6 (6.67)	5 (5.56)	4 (4.44)	2 (2.22)	2 (2.22)

黄曲霉区分外, 其余丝状真菌菌属均鉴定到种水平(98.89%、89/90)。不同方法鉴定结果见表2。

四、双甲酸夹心法和甲酸乙腈萃取法前处理质谱鉴定结果

根据自定义得分标准, 双甲酸夹心法和甲酸乙腈萃取法前处理提取丝状真菌蛋白质质谱鉴定曲霉菌种水平分别为69株(98.57%、69/70)和68株

(97.14%、68/70), 但鉴定准确率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.34$ 、 $P = 0.95$); 两种前处理方法均可100%鉴定烟曲霉、黄曲霉、赛多孢菌和链格孢霉到种水平, 其中烟曲霉和黄曲霉分别有88.57%和76.92%鉴定得分 ≥ 2.0 分, 鉴定结果较好; 1株木霉鉴定时获得蛋白图谱但未给出鉴定结果, 两种前处理方法鉴定丝状真菌的结果详见表3。

表2 MALDI-TOF MS 鉴定与形态学和PCR 方法鉴定丝状真菌[株(%)]

菌株	株数	形态学鉴定		MALDI-TOF MS		PCR方法
		种水平	属水平	种水平	属水平	
曲霉菌属	70	62 (68.89)	8 (8.89)	69 (76.67)	1 (1.11)	69 (76.67)
烟曲霉	47	42 (46.67)	5 (5.56)	47 (52.22)	0 (0.00)	47 (52.22)
黄曲霉	13	13 (14.44)	0 (0.00)	13 (14.44)	0 (0.00)	12 (13.33) ^a
黑曲霉	4	4 (4.44)	0 (0.00)	4 (4.44)	0 (0.00)	4 (4.44)
构巢曲霉	2	2 (2.22)	0 (0.00)	2 (2.22)	0 (0.00)	2 (2.22)
其他曲霉菌	4	1 (1.11)	3 (3.33)	3 (3.33)	1 (1.11)	4 (4.44)
青霉菌属	6	0 (0.00)	6 (6.67)	2 (2.22)	4 (4.44)	6 (6.67)
绳状青霉	2	0 (0.00)	2 (2.22)	0 (0.00)	2 (2.22)	2 (2.22)
橘青霉	2	0 (0.00)	2 (2.22)	2 (2.22)	0 (0.00)	2 (2.22)
草酸青霉	2	0 (0.00)	2 (2.22)	0 (0.00)	2 (2.22)	2 (2.22)
链格孢霉	5	0 (0.00)	5 (5.56)	5 (5.56)	0 (0.00)	5 (5.56)
镰刀菌属	4	0 (0.00)	4 (4.44)	4 (4.44)	0 (0.00)	4 (4.44)
赛多孢菌	2	0 (0.00)	2 (2.22)	2 (2.22)	0 (0.00)	2 (2.22)
毛霉	1	0 (0.00)	1 (1.11)	0 (0.00)	1 (1.11)	1 (1.11)
根霉	1	0 (0.00)	1 (1.11)	0 (0.00)	1 (1.11)	1 (1.11)
木霉	1	0 (0.00)	1 (1.11)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (1.11)
合计	90	62 (68.89)	28 (31.11)	82 (91.11)	7 (7.78)	89 (98.89)

注:^aPCR 无法区分黄曲霉和米曲霉, 1株米曲霉认为到属水平

表3 两种前处理方法鉴定丝状真菌得分[株(%)]

菌株	株数	双甲酸夹心法		甲酸乙腈萃取法	
		种水平 (≥ 1.7 分)	属水平 (1.5~1.7分)	种水平 (≥ 1.7 分)	属水平 (1.5~1.7分)
曲霉菌属	70	69 (76.67)	1 (1.11)	68 (75.56)	2 (2.22)
青霉菌属	6	2 (2.22)	4 (4.44)	2 (2.22)	4 (4.44)
链格孢霉	5	5 (5.56)	0 (0.00)	5 (5.56)	0 (0.00)
镰刀菌属	4	4 (4.44)	0 (0.00)	4 (4.44)	0 (0.00)
赛多孢菌属	2	2 (2.22)	0 (0.00)	2 (2.22)	0 (0.00)
毛霉	1	0 (0.00)	1 (1.11)	0 (0.00)	1 (1.11)
根霉	1	0 (0.00)	1 (1.11)	0 (0.00)	1 (1.11)
合计	90	82 (91.11)	7 (6.67)	81 (90.00)	8 (8.89)
耗时		耗时长, 10 min		耗时长, 0.5~1 h	
操作		简单方便, 减少实验室污染和生物安全风险		繁琐, 多次离心, 存在实验室污染和生物安全风险	
丝状真菌生长时段		24~48 h幼龄丝状真菌即可鉴定, 2 d鉴定结果最好		48~72 h, 鉴定结果好	
培养基		任何培养基, 无特殊要求		液体培养基鉴定结果较好	

讨 论

近年来侵袭性真菌感染呈现增加趋势,尤其侵袭性丝状真菌感染给临床诊治带了极大挑战,早期病原学诊断对感染者的及时救治十分重要。因曲霉菌在环境中的分布广泛,烟曲霉、黄曲霉和黑曲霉等目前仍是引起侵袭性丝状真菌感染最为常见的条件致病菌^[5-7]。而近年研究^[3-5]表明,越来越多的对常用抗真菌药物耐药或不敏感的曲霉菌和非曲霉丝状真菌被分离和报道,导致临床选择抗真菌药物非常棘手。因此,探究快速鉴定丝状真菌种属的方法成为很多学者研究的热点之一。MALDI-TOF MS技术在鉴定细菌和念珠菌中凸显了较好的鉴定优势,但因丝状真菌本身特点(细胞壁厚、菌丝大小和孢子成分等)、质谱数据库限制及前处理方法繁琐等原因,MALDI-TOF MS技术在鉴定丝状真菌方面一直处于研究状态^[18-22],应用于临床检测相对较少。本研究选择临床分离丝状真菌,检测过程严格按照质谱仪器的标准操作说明中提供的甲酸乙腈萃取丝状真菌蛋白方法和文献^[18]中双甲酸夹心提取蛋白方法进行丝状真菌前处理,将质谱鉴定结果与形态学和分子生物学鉴定结果进行对比,以寻找适合实验室的快速鉴定丝状真菌的方法。

本研究共收集90株丝状真菌菌株,77.78%为曲霉菌,主要为烟曲霉、黄曲霉和黑曲霉等常见菌,与既往文献^[4-6]报道一致,本研究还分离到镰刀菌、赛多孢菌、链格孢菌及接合菌等非曲霉丝状真菌。本研究中菌株的标本大多来源于呼吸道,主要为痰标本(78.89%)和肺泡灌洗液,其次为角膜和耳道分泌物标本。痰标本中分离率最多的为曲霉菌,其次为青霉菌属,与环境中此二类菌分布广泛且易通过气溶胶吸入呼吸道而定植或引起感染有关;角膜分泌物中分离到链格孢霉和镰刀菌,与既往报道^[23]真菌性角膜炎常见病原一致;耳道分泌物分离最多为黑曲霉,而镰刀菌属在多种标本均有分离,说明镰刀菌可导致多部位感染,因其对常用抗菌药物不敏感、病死率高,应引起重视。

本研究显示与PCR测序结果相比,质谱鉴定丝状真菌至种水平的准确率(91.11%)显著高于形态学鉴定(68.89%),与以往研究结果一致^[12, 14]。无论双甲酸夹心法和甲酸乙腈萃取法前处理方法,质谱对曲霉菌(烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉)、镰刀菌、赛多孢菌和链格孢霉的鉴定准确率高(>

98%);但对接合菌(毛霉、根霉)和青霉的鉴定率低,这与质谱数据库中菌种数据和图谱缺少、无法完成匹配相关。本研究中1株黄曲霉未能经PCR-ITS测序鉴定,与研究报道^[19]黄曲霉与米曲霉的基因序列相似性高无法区分有关,而本研究通过质谱聚类分析能够较好区分二者,本研究将在今后收集更多黄曲霉菌株后进行进一步分析证实。

双甲酸夹心法和甲酸乙腈萃取法两种前处理方法鉴定丝状真菌到种水平差异无统计学意义,两种前处理方法均可100%鉴定烟曲霉、黄曲霉、赛多孢菌和链格孢霉到种水平,临床常见的烟曲霉和黄曲霉鉴定得分 ≥ 2.0 分,鉴定率较好;相比而言,双甲酸夹心法操作流程更简便快速、无需特殊培养基、对幼龄菌可实现早期鉴定,与文献^[19]报道选用菌丝部位(产孢前的幼龄菌)破壁效果好,丝状真菌的鉴定结果好相一致,更适合实验室常规检测;而甲酸乙腈萃取法操作相对繁琐,对生长在液体培养基和相对成熟的丝状真菌鉴定结果好^[22]。可见,对于临床常见的丝状真菌(如曲霉菌)采用前处理后质谱有较高的鉴定准确率,在实验室检测中可代替形态学鉴定或作为传统鉴定方法的补充。

本研究也存在不足之处,如用于实验分离菌中77.78%为曲霉菌,其他类型丝状真菌数量较少,因此,在后续的工作中将继续收集更多菌株以进一步深入研究质谱技术在丝状真菌鉴定中的临床价值。MALDI-TOF MS技术鉴定丝状真菌影响因素多,仍需要进一步探索,不断优化和标准化样本的前处理方法和操作步骤^[24],规范操作流程,以提高MALDI-TOF MS鉴定丝状真菌的能力;结合自身实验室特点^[25]和本地流行病学状况,建立个性化数据库,使丝状真菌的鉴定数据库不断完善和扩大,提高鉴定准确率,更好地发挥质谱在快速鉴定中的作用。

参 考 文 献

- [1] Lin CY, Wang IT, Chang CC, et al. Comparison of clinical manifestation, diagnosis, and outcomes of invasive pulmonary aspergillosis and pulmonary mucormycosis[J]. Microorganisms, 2019, 7(11): 531-541.
- [2] 吕玮, 刘正印. 侵袭性真菌感染临床诊治中应注意的问题[J]. 中华内科杂志, 2019, 58(8): 553-555.
- [3] 周新. 侵袭性肺曲霉病诊治需要注意的几个问题[J]. 中国临床新医学, 2019, 12(1): 1-4.
- [4] 杨帆. 肺曲霉感染患者的微生物检验与临床诊治研究[J]. 中国疗养医学, 2019, 28(2): 205-207.
- [5] 张莉莉, 王强兄, 沈亮亮, 等. 曲霉菌临床分离株的分子鉴定及体外抗真菌药物敏感性分析[J]. 同济大学学报(医学版), 2018, 39(1): 70-

- 75.
- [6] 李莎莎, 姚瑶, 周晓燕, 等. 2013-2015年院内曲霉菌感染的菌群分布及流行情况分析[J]. 宁夏医学杂志, 2018, 40(1): 71-73.
- [7] 徐和平, 黄江山. 临床常见曲霉形态学鉴定[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(10): 758-764.
- [8] 王秀媛. 革兰染色在真菌菌丝鉴别中的价值[J]. 实用检验医师杂志, 2018, 10(1): 13-14.
- [9] 王岩, 曹敬荣, 常玥, 等. 分离胶法与十二烷基硫酸钠法在血培养阳性瓶基质辅助激光解析电离飞行时间质谱病原菌直接鉴定中的应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018, 12(4): 324-329.
- [10] 麻雅婷, 杨明, 何赏, 等. 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱研究白色念珠菌血流感染的血清多肽指纹图谱[J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(1): 23-27.
- [11] Reeve MA, Buddie AG, Pollard KM, et al. A highly-simplified and inexpensive MALDI-TOF mass spectrometry sample-preparation method with broad applicability to microorganisms, plants, and insects[J]. J Biol Methods, 2018, 5(4): e103-e116.
- [12] 吴友伟, 石红, 刘万静, 等. MALDI-TOF-MS技术快速鉴定丝状真菌的临床评价[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(21): 3155-3156, 3159.
- [13] Reeve MA, Caine TS, Buddie AG. Spectral grouping of nominally aspergillus versicolor microbial-collection deposits by MALDI-TOF MS[J]. Microorganisms, 2019, 7(1): 235-450.
- [14] 黄艳飞, 常峥, 白婕, 等. 丝状真菌质谱鉴定前处理方法及应用[J]. 中华内科杂志, 2017, 97(30): 2379-2383.
- [15] Sanguinetti M, Posteraro B. Identification of molds by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(2): 369-379.
- [16] Nakamura S, Sato H, Tanaka R, et al. Ribosomal subunit protein typing using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification and discrimination of aspergillus species[J]. BMC Microbiol, 2017, 17(1): 100.
- [17] McMullen AR, Wallace MA, Pincus DH, et al. Evaluation of the VITEK MS MALDI-TOF MS system for identification of clinically relevant filamentous fungi[J]. J Clin Microbiol, 2016, 25(1): 816-825.
- [18] 苍金荣, 王翠, 王曦, 等. “双甲酸夹心”快速样本前处理方法的建立及在丝状真菌质谱鉴定中的初步应用[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(3): 21-23.
- [19] 张敬霞, 曲芬. 飞行时间质谱技术鉴定丝状真菌的研究进展[J]. 传染病信息, 2018, 31(2): 171-174.
- [20] 郭鹏豪, 刘秀丽, 崔颖鹏, 等. 真菌通用引物Its1和Its4在丝状真菌鉴定中的价值评价[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(8): 922-924.
- [21] 李颖, 徐英春. MALDI-TOF MS在病原性丝状真菌鉴定中的应用进展[J]. 中国真菌学杂志, 2017, 12(6): 378-381.
- [22] Zhou L, Chen Y, Xu Y. Performance of VITEK mass spectrometry (V3.0) for rapid identification of clinical Aspergillus fumigatus in different culture conditions on the base of ribosomal protein[J]. Infect Drug Resist, 2017, 10(2): 499-506.
- [23] Chidambaram JD, Venkatesh Prajna N, Srikanthi P, et al. Epidemiology, risk factors, and clinical outcomes in severe microbial keratitis in South India[J]. Ophthalmic Epidemiol, 2018, 25(4): 297-305.
- [24] 胡继红, 马筱玲, 王辉, 等. MALDI-TOF MS在临床微生物鉴定中的标准化操作专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(4): 241-249.
- [25] 杨启文, 倪语星, 林丽开, 等. 临床微生物实验室真菌检测能力建设基本要求专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(7): 514-518.
- (收稿日期: 2019-11-22)
(本文编辑: 孙荣华)

曹敬荣, 王岩, 谢威, 等. 质谱技术快速鉴定临床分离丝状真菌的应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2020, 14(5): 374-379.