

• 论 著 •

MALDI-TOF-MS 技术快速鉴定丝状真菌的临床评价^{*}吴友伟^{1,2}, 石 红¹, 刘万静¹, 答 嵘^{1△}

(1. 西安交通大学第一附属医院检验科, 西安 710061;

2. 西安交通大学第三附属医院消化内二科, 西安 710068)

摘要:目的 探讨基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术在丝状真菌快速鉴定中的临床应用价值。方法 对西安交通大学第一附属医院 2015 年 3 月至 2017 年 1 月分离自临床的丝状真菌进行聚合酶链式反应(PCR)测序鉴定与 MALDI-TOF-MS 鉴定,同时回顾形态学方法鉴定结果,对丝状真菌菌种分布、标本来源进行分析,采用 *Kappa* 值一致性评价方法对质谱鉴定与形态学方法鉴定结果进行统计分析。结果 本研究共包含分离自临床的丝状真菌 102 株,非重复分离株 83 株。烟曲霉 50 株(60.24%),黄曲霉 26 株(31.33%)。标本来源主要为呼吸道标本,其中痰液 68 株(81.93%),支气管灌洗液 11 株(13.25%)。MALDI-TOF-MS 技术与形态学方法鉴定结果比对,*Kappa* 值为 0.141 0。结论 MALDI-TOF-MS 技术在丝状真菌鉴定正确性与时效性优于形态学方法。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 丝状真菌; 形态学方法; 评价

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.21.008 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)21-3155-03

Clinical evaluation of MALDI-TOF-MS in identification of filamentous fungi^{*}WU Youwei^{1,2}, SHI Hong¹, LIU Wanjing¹, DA Rong^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China; 2. Department of Gastroenterology Second Internal Medicine, the Third Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710068, China)

Abstract: Objective By comparing the identification results of clinical strains of filamentous fungi using MALDI-TOF-MS and morphological identification, explore the clinical application value of MALDI-TOF-MS in the rapid identification of filamentous fungi. Methods The study was conducted in the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University between March 2015 and January 2017. Eighty-three clinical strains of filamentous fungi were identified using PCR and sequencing as well as the MALDI-TOF-MS. Morphological identification results was reviewed in LIS; species distribution and specimen source of filamentous fungi were analyzed. The consistent of mass spectrometry and morphological identification were appraised with *Kappa* value consistent evaluation method. Results This study enrolled 102 strains of filamentous fungi, including 83 non-repeated strains. *Aspergillus fumigatus* was the most common strains, including 50 strains (60.24%), followed by *Aspergillus flavus* of 26 strains (31.33%). Specimen source were mainly respiratory specimens, including sputum of 68 strains (81.93%) and bronchial lavage of 11 strains (13.25%). The results of MALDI-TOF-MS and morphology method were appraised and the *Kappa* value was 0.141. Conclusion MALDI-TOF-MS was a rapid detection method and was better in accuracy of identification of filamentous fungi than morphological method.

Key words: MALDI-TOF-MS; filamentous fungi; morphological method; evaluation

随着丝状真菌相关侵袭性疾病的增加,快速准确的菌种水平鉴定对于抗真菌治疗至关重要。传统的丝状真菌鉴定主要依赖于有经验的技师采用形态学方法进行检测,虽然简便、经济,但对技师的技术水平要求高,而且对非典型特征菌株的鉴定较为困难。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)是新近发展用于临床微生物实验室的一种快速经济、操作简单的病原微生物检测方法,可应用于细菌与真菌的检验^[1-2]。丝状真菌由于蛋白提取困难及蛋白表达易受培养条件影响,采用 MALDI-TOF-MS 技术对其进行鉴定尚未在临床微生物实验室作为常规项目开展。本研究通过采用聚合酶链式反应(PCR)测序确定种类的丝状真菌临床分离株,并采用 MALDI-TOF-MS 鉴定,同时与形态学方法鉴定结果进行比对,探讨 MALDI-TOF-MS 技术对临床丝状真菌快速鉴定的临床应用价值。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 分离自 2015 年 3 月至 2017 年 1 月西安交通大学第一附属医院检验科送检的临床微生物培养标本,鉴定为丝状真菌,保存菌株。通过实验室信息系统(LIS)收集形态学方法鉴定结果。

1.2 仪器与试剂 采用 VITEK MS 全自动快速质谱微生物检测系统(生物梅里埃,法国)、T100M PCR 仪(BIO-RAD,美国)、血琼脂平板(生物梅里埃,法国)、沙保弱琼脂平板(安图生物,中国)、酵母基因组 DNA 提取试剂盒与破壁酶(天根生化科技有限公司,中国)、Taq PCR Master Mix(天根生化科技有限公司,中国)。引物合成与 PCR 产物序列测定由生工生物工程股份有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 培养鉴定方法 送检标本按检验项目接种于血琼脂平

^{*} 基金项目:西安交通大学第一附属医院基金资助项目(2014YK30)。

作者简介:吴友伟,女,副主任医师,主要从事临床感染方面的研究。△ 通信作者,E-mail:da_rong@163.com。

板或沙保弱琼脂平板,如有丝状真菌生长压片则在显微镜下观察形态,根据菌落与镜下形态特点判定丝状真菌种类。

1.3.2 PCR 测序鉴定方法 采用沙保弱琼脂平板复苏保存的临床菌株,按前述方法用棉签刮取菌落,进行 DNA 提取与真菌 ITS 基因扩增^[3]。先用含有破壁酶的山梨醇缓冲液破除细胞壁,进行酵母菌基因组 DNA 提取。提取的 DNA 进行 PCR 扩增,产物电泳后进行核酸序列测定。测序结果与 Gen-Bank 进行比对,确定丝状真菌种类。

1.3.3 MALDI-TOF-MS 方法 采用沙保弱琼脂平板复苏保存的临床菌株,用湿棉签刮取 1~2 cm 直径的菌落,重悬于 900 μ L 70% 的乙醇中。10 000 r/min 离心 2 min,弃上清液。加入 40 μ L 新鲜配制的 70% 甲酸,混匀后加入 40 μ L 乙腈。涡旋混匀后,10 000 r/min 离心 2 min。取上清 2 μ L 点样于靶板上,自然干燥后加上 1 μ L CHCA 基质。自然干燥后,采用 VITEK MS 全自动快速质谱微生物检测系统进行检测。

1.4 统计学处理 计数资料采用例数或率进行表示,MALDI-TOF-MS 与形态学方法鉴定结果采用 *Kappa* 值一致性评价方法进行鉴定正确率的一致性评价。

2 结 果

2.1 丝状真菌菌种分布 本研究共有分离自临床的丝状真菌 102 株,非重复分离株为 83 株。其中烟曲霉菌 50 株(60.24%),黄曲霉菌 26 株(31.33%),黑曲霉菌 4 株(4.83%),米曲霉菌 1 株(1.20%),*Aspergillus lentulus* 1 株(1.20%),绳状青霉菌 1 株(1.20%)。

2.2 丝状真菌标本类型分布 分离自临床的丝状真菌患者标本类型主要为呼吸道标本。68 株为痰液标本,其中烟曲霉菌 39 株,黄曲霉菌 23 株,黑曲霉菌 3 株,米曲霉菌 1 株,*Aspergillus lentulus* 1 株,绳状青霉菌 1 株;11 株为支气管灌洗液标本,其中烟曲霉菌 8 株,黄曲霉菌 3 株;2 株为分泌物标本,其中烟曲霉菌 1 株,黑曲霉菌 1 株;1 株为房水标本,为烟曲霉菌;1 株为导管标本,为烟曲霉菌。

2.3 丝状真菌标本鉴定结果 分离自临床的丝状真菌分别采用 MALDI-TOF-MS 技术与形态学方法进行鉴定,鉴定结果均与 PCR 测序鉴定结果比对。鉴定结果一致认为鉴定正确,未鉴定到种或鉴定结果不一致则认为鉴定错误。采用 *Kappa* 值一致性评价方法计算,观察一致性为 0.698 8,机遇一致性为 0.649 4,*Kappa* 值为 0.141 0。见表 1。

表 1 丝状真菌标本鉴定结果正确性比较[n(%)]

菌种	MALDI-TOF-MS	形态学方法
	鉴定正确	鉴定正确
烟曲霉菌	50(100.00)	45(90.00)
黄曲霉菌	26(100.00)	8(30.77)
黑曲霉菌	1(25.00)	3(75.00)
米曲霉菌	0(0.00)	0(0.00)
<i>Aspergillus lentulus</i>	0(0.00)	0(0.00)
绳状青霉菌	0(0.00)	0(0.00)
合计	77(92.78)	56(67.47)

2.4 丝状真菌鉴定方法比较 分离自临床的丝状真菌鉴定方法主要包括形态学方法鉴定、MALDI-TOF-MS 与 PCR 测序技术,对每种方法的优劣进行比较,得出结论:MALDI-TOF-

MS 技术需要特殊仪器,所需时间少,可自动判读结果,操作方法简单,对检测人员技术水平要求低,单次检测成本相对较低;形态学方法鉴定不需要特殊仪器,所需时间较少,需人工判读结果,操作方法复杂,对检测人员技术水平要求高,单次检测成本最低;PCR 测序需要特殊仪器,所需时间长,需人工判读结果,操作方法较复杂,对检测人员技术水平要求较高,单次检测成本高。

3 讨 论

MALDI-TOF-MS 技术原理是样品与基质形成共结晶晶体后,使用一定强度的激光照射使基质与样品之间发生电荷转移,样品分子电离后在电场作用下通过飞行管道,飞行时间决定了离子的质量电荷比。测得的多肽或蛋白质按相对分子质量排列形成特异的蛋白质峰图,通过与蛋白质指纹图谱比对获得微生物的鉴定结果。目前,MALDI-TOF-MS 技术不仅可应用于微生物的检测,还可用于对阳性血培养的检测,未来也可用于流行病学、耐药性与临床标本的直接检测^[4]。MALDI-TOF-MS 技术的微生物检测主要用于细菌与酵母菌,丝状真菌由于其结构复杂,需对标本进行前处理、提取蛋白后才能进行鉴定。本研究采用 MALDI-TOF-MS 技术对分离自临床的 83 株非重复分离株进行检测,并与传统形态学方法鉴定结果进行比对,评价 MALDI-TOF-MS 技术在丝状真菌鉴定中的应用价值,同时获得 MALDI-TOF-MS 鉴定丝状真菌培养条件与菌株前处理的经验。

由于西安交通大学第一附属医院地处西北,每年冬季分离自临床的丝状真菌相对较多,且绝大多数为呼吸道标本,本研究从 2015 年 3 月至 2017 年 1 月共收集非重复的曲霉菌 82 株,青霉菌 1 株。其中烟曲霉菌达到 60.24%,黄曲霉菌为 31.33%。68 株分离自痰液标本,11 株分离自支气管灌洗液,提示丝状真菌感染以曲霉菌为主,并多引起呼吸道感染。

有学者采用 MALDI-TOF-MS 技术对丝状真菌进行鉴定,其中 85.6% 的菌株得到正确鉴定,形态学方法检测则仅有 61.5% 的菌株能够正确鉴定到种,提示 MALDI-TOF-MS 技术在丝状真菌鉴定方面优于形态学方法^[5]。本研究对所有菌株进行 PCR 测序鉴定,获得菌种分类,并采用 MALDI-TOF-MS 技术进行鉴定,同时回顾形态学方法鉴定结果,均与 PCR 测序鉴定结果进行比对。MALDI-TOF-MS 技术正确鉴定 77 株(92.78%),形态学方法仅为 56 株(67.47%)。采用 *Kappa* 值一致性评价方法,结果表明两者一致性较差(*Kappa* = 0.141 0),提示 MALDI-TOF-MS 技术在丝状真菌鉴定正确性方面优于形态学方法。

有学者利用 MALDI-TOF-MS 技术检测 44 株曲霉菌,成功鉴定 36 株(81.8%)。若仅计算数据库中所包含菌株,则 100% 曲霉菌可被准确鉴定^[6],曲霉菌属 93.6% 能够准确鉴定到种^[7]。本研究显示,烟曲霉菌与黄曲霉菌鉴定率达到 100.00%,但是黑曲霉菌鉴定率仅为 25.00%,可能是由于曲霉菌中的黑素干扰鉴定结果,造成蛋白质图谱中某些临床菌种缺乏特异度峰值或峰数目不足,虽能得到蛋白质图谱,但是与数据库比对却无法获得鉴定结果。

有学者将 22 株临床常见丝状真菌参考菌株进行常规培养,分别于培养 48、72、96、120 h 时进行 MALDI-TOF-MS 技术检测,发现 120 h 时能够获得高质量的图谱^[8]。本研究对临床菌株采用沙保弱琼脂平板在 37 $^{\circ}$ C 进行培(下转第 3159 页)

妄发生的机制尚未完全明确,可能包括:(1)氧供与氧耗失衡,脑组织缺氧,组织水肿可能会导致精神障碍^[8];(2)多巴胺水平上升,缺氧失衡可能导致细胞外液中的多巴胺水平升高^[9];(3)缺氧导致脑组织损伤,ICU 患者缺氧时脑组织容易受损,引起谵妄发生^[10];(4)乙酰胆碱水平下降,这是脑组织电活动的基础,和记忆、睡眠周期等都有密切关系,缺氧会导致乙酰胆碱释放、合成减少,增加了谵妄发生的风险^[11]。

综上所述,缺氧应包括氧耗过大和氧输送不够,谵妄患者存在氧化代谢障碍,但局部氧化代谢如脑氧化代谢无法监测,且存在血液再分布机制,使得全身 O₂ER 与谵妄无相关性,有待进一步开展脑局部 O₂ER 监测等临床研究。

参考文献

[1] Balas MC, Vasilevskis EE, Olsen KM, et al. Effectiveness and safety of the awakening and breathing coordination, delirium monitoring management, and early exercise mobility bundle[J]. Crit Care Med, 2014, 42(5): 1024-1036.

[2] 庞礴, 查佳安, 方长太, 等. ICU 机械通气患者谵妄亚型分析[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(3): 305-308.

[3] Artur HH, Luiz EFR, Ricardo S, et al. Cardiopulmonary exercise test: background, applicability and interpretation [J]. Arq Bras Cardiol, 2016, 107(5): 467-481.

[4] Louis G, Amy FS, David AB, et al. Modeling of cerebral oxygen transport based on in vivo microscopic imaging of microvascular network structure, blood flow, and oxygenation[J]. Front Comput Neurosci, 2016, 10(10): 82-85.

(上接第 3156 页)

养,发现当培养时间长于 96 h 后,真菌菌落孢子囊生长丰富并呈特殊颜色,此时进行检测能够获得满意结果。研究发现,将菌种置于含有庆大霉素与氯霉素的沙氏培养基中在 27 ℃ 培养 72 h,用蚁酸和乙腈抽提菌落能够得到更多的峰和 Log 值,且重复性好,操作简便。本研究采用甲酸与乙腈抽提菌体蛋白,鉴定效果良好。

综上所述, MALDI-TOF-MS 技术在丝状真菌鉴定中具有广阔的应用前景,具有快速、简便、对技术水平要求低等优势,但也存在某些不足。因真菌在不同的培养基、温度、培养时间等条件下,蛋白表达存在差异,菌株库有待完善^[9]。

参考文献

[1] 王欢, 曲芬. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在真菌快速鉴定中的应用[J]. 传染病信息, 2016, 29(3): 129-132.

[2] 王冲, 占萍, 刘维达. MALDI-TOF MS 技术在临床病原真菌鉴定中的应用进展[J]. 中国真菌学杂志, 2013, 8(6): 369-373.

[3] 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]. 中国微生物生态学杂志, 2013, 25(8): 922-924.

[4] 罗燕萍. 质谱技术在临床微生物实验室中的应用前景[J]. 检验医学, 2015, 30(2): 97-101.

[5] Marzieh F, Mari H, Quentin PPC, et al. Determinants of ventilation and pulmonary artery pressure during early acclimatization to hypoxia in humans[J]. J Physiol, 2016, 594(5): 1197-1213.

[6] Wu YF, Zhang N, Xu Y, et al. Effects of dopamine, norepinephrine and dobutamine on gastric mucosal pH of septic shock patients[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(2): 975-978.

[7] Ryan LH, Anthony RB, Mathew GR, et al. Hypoxemia, oxygen content, and the regulation of cerebral blood flow [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2016, 310(5): R398-413.

[8] Maldonado JR. Neuropathogenesis of delirium: review of current etiologic theories and common pathways[J]. Am J Geriatr Psychiatry, 2013, 21(12): 1190-1222.

[9] Zhang WY, Wu WL, Gu JJ, et al. Risk factors for postoperative delirium in patients after coronary artery bypass grafting: A prospective cohort study[J]. J Critical Care, 2015, 30(3): 606-612.

[10] 赵偷华. 冠心病重症监护病房患者发生谵妄的相关危险因素分析[J]. 海南医学, 2014, 25(14): 2121-2123.

[11] 董丽宏, 肖李乐云, 朱晓琳. 重症监护室患者谵妄发生情况及其影响因素分析[J]. 中国医药导报, 2014, 11(35): 41-44.

(收稿日期: 2017-04-23 修回日期: 2017-07-04)

[5] Becker PT, Bel A, Martiny D, et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library[J]. Med Mycol, 2014, 52(8): 826-834.

[6] Iriart X, Lavergne RA, Fillaux J, et al. Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(6): 2107-2110.

[7] McMullen R, Wallace A, Pincus H, et al. Evaluation of the vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of clinically relevant filamentous fungi[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(8): 2068-2073.

[8] Chierico F, Masotti A, Onori M, et al. MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin[J]. J Proteomics, 2012, 75(11): 3314-3330.

[9] Normand AC, Cassagne C, Ranque S, et al. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries[J]. BMC Microbiol, 2013, 13(1): 1-14.

(收稿日期: 2017-05-02 修回日期: 2017-07-13)