

• 论 著 •

MALDI-TOF-MS 技术在临床分离丝状真菌鉴定中的应用研究\*

谢春霞, 孙玉娟, 马艳辉, 赵白云<sup>△</sup>  
青島市中心医院检验科, 山东青島 266042

**摘要:**目的 探究基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术在临床分离丝状真菌鉴定中的应用。**方法** 收集 2019 年 1—12 月该院临床标本中分离培养的 230 株常见丝状真菌,行 MALDI-TOF-MS 技术鉴定,并传统形态学及 DNA 基因测序结果进行综合对比,评价 MALDI-TOF-MS 技术在丝状真菌鉴定中的能力。**结果** 临床分离 230 株丝状真菌包括曲霉属 183 株(79.6%)、青霉属 23 株(10.0%)、镰刀菌属 13 株(5.7%)、石膏样小孢子菌 6 株(2.6%)、根毛霉 3 株(1.3%)、米根霉 2 株(0.9%);主要来源于痰液及肺泡灌洗液,其次为角膜分泌物和耳道分泌物。传统形态学鉴定到种水平的准确率为 69.1%,主要为烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉等常见曲霉菌,其余均鉴定到属水平。DNA 基因测序分析鉴定到种水平的准确率为 100.0%。MALDI-TOF-MS 技术鉴定丝状真菌到种水平的准确率为 88.7%,主要为曲霉属和镰刀菌属;其鉴定丝状真菌曲霉属中烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉及镰刀菌属到种水平的准确率为 100.0%,与 DNA 测序方法结果符合一致。以 DNA 测序结果为准,MALDI-TOF-MS 技术鉴定丝状真菌到种水平的准确率显著高于传统形态学鉴定( $\chi^2=26.455, P<0.001$ )。**结论** MALDI-TOF-MS 技术鉴定临床丝状真菌符合率高,快速、准确且操作便捷,可作为临床真菌实验室鉴定的有效补充手段,为真菌鉴定提供了新的选择。

**关键词:**基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 丝状真菌; 传统形态学  
**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2022.08.012 **中图法分类号:**R446.5  
**文章编号:**1673-4130(2022)08-0950-06 **文献标志码:**A

Application of MALDI-TOF-MS technique in clinical isolation of filamentous fungi identification\*  
XIE Chunxia, SUN Yujuan, MA Yanhui, ZHAO Ziyun<sup>△</sup>

*Department of Clinical Laboratory, Qingdao Central Hospital, Qingdao, Shandong 266042, China*  
**Abstract:** **Objective** To explore the application of matrix assisted laser desorption and ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) technique in the identification of clinical isolated filamentous fungi. **Methods** A total of 230 strains of common filamentous fungi isolated and cultured from clinical specimens in a hospital from January to December 2019 were collected and identified by MALDI-TOF-MS. The results were comprehensively compared with those of traditional morphology and DNA sequencing to evaluate the ability of MALDI-TOF-MS in the identification of filamentous fungi. **Results** Clinical isolates of 230 filamentous fungi included 183 strains of *Aspergillus* (79.6%), 23 strains of *Penicillium* (10.0%), 13 strains of *Fusarium* (5.7%), 6 strains of *Microsporum gypseum* (2.6%), 3 strains of *Rhizopus rhizopus* (1.3%), and 2 strains of *Rhizopus oryzae* (0.9%); The main sources were sputum and alveolar lavage fluid, corneal and ear canal secretions. The accuracy of traditional morphological identification to species level was 69.1%, the main species were *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Niger* and other common *Aspergillus*, and the rest were identified to genus level. The accuracy of DNA sequencing analysis to the species level was 100.0%. The accuracy of MALDI-TOF-MS technique in identifying filamentous fungi to species level was 88.7%, which mainly belonged to *Aspergillus* and *Fusarium*; The accuracy rate of identifying *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Niger* and *Fusarium* in *Aspergillus* filamentous fungi to species level was 100.0%, which was consistent with the results of DNA sequencing. Based on DNA sequencing results, the accuracy of MALDI-TOF-MS technique in identifying filamentous fungi to the species level was significantly higher than that of morphological identification ( $\chi^2=26.455, P<0.001$ ). **Conclusion** MALDI-TOF-

\* 基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2019HM072)。  
作者简介: 谢春霞, 女, 主管技师, 主要从事微生物检验研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: Zhaoziyun830@126.com。  
本文引用格式: 谢春霞, 孙玉娟, 马艳辉, 等. MALDI-TOF-MS 技术在临床分离丝状真菌鉴定中的应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(8): 950-955.

MS technique has a high coincidence rate, rapid, accurate and convenient operation, and can be used as an effective supplementary means for clinical fungal laboratory identification, providing a new choice for fungal identification.

**Key words:** matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; filamentous fungi; traditional morphology

近年来,随着免疫制剂的不断应用、介入治疗技术的开展及抗菌药物的更新换代,使得临床真菌感染患者越来越多,其致死率明显上升<sup>[1]</sup>。临床真菌感染主要以丝状真菌和酵母型真菌感染危害最大,其中丝状真菌在某些特定人群中感染率超过酵母型真菌<sup>[2]</sup>。真菌感染病情严重,进展迅速,不同属种真菌对临床常用一线抗真菌药物敏感性不同,效果有限,因此,及时有效的诊断及感染真菌种属鉴定对于指导临床抗真菌用药治疗意义重大。目前,对于临床微生物的实验室检测主要依靠传统形态学和基因分子生物学,然前者准确率低、耗时长,要求检测人员具有丰富的真菌鉴定经验及专业知识水平,且对于传统形态学较相似的菌株无法准确鉴别;后者鉴定结果精确,但其成本高,对实验室条件及环境要求高,不适合临床常规开展<sup>[3]</sup>。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术是近年新兴的一种微生物鉴定技术,适用于细菌、真菌及病毒的鉴定,准确性高,快速、便捷,近年在细菌、酵母型真菌中的鉴定能力得到肯定<sup>[4-5]</sup>。因丝状真菌结构复杂,蛋白提取预处理方法尚未形成标准化操作流程等使得 MALDI-TOF-MS 技术在临床丝状真菌鉴定中的应用相对滞后,相关报道有限。因此本研究结合传统形态学和分子生物学 DNA 测序,综合对比探究了 MALDI-TOF-MS 技术在临床分离丝状真菌中的鉴定效果。

## 1 材料与方法

**1.1 实验菌株** 收集 2019 年 1—12 月本院临床标本中分离培养的 230 株常见丝状真菌,经初步鉴定为丝状真菌菌株,低温保存于菌种保存管。校准菌株为大肠埃希菌 ATCC8739,质控菌株为 ATCC10106 产黄青霉、ATCC16888 黑曲霉(购自法国梅里埃生物公司)。

**1.2 仪器与试剂** MALDI-TOF-MS 质谱仪购自法国生物梅里埃公司;ABI600PCR 仪购自美国 ABI 公司;沙氏培养基购自北京智杰方远科技有限公司;凝胶成像系统购自英国 Syngene 公司;血平板购自美国赛默飞公司;DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;PCR 产物测序及真菌引物合成由上海生工公司完成;BASO 棉蓝染液购自珠海贝索生物有限公司;甲酸、乙腈购自德国布鲁克公司;Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒、通用引物 ITS1 和 ITS4 购自生工 Sangon Biotech 公司等。

## 1.3 方法

**1.3.1 真菌分离培养及传统形态学鉴定** 将收集菌

株接种于沙氏培养基,置于 20 ℃ 培养箱培养 2~14 d;待丝状真菌长出菌落后,取清洁载玻片滴加棉蓝染液 1 滴,透明胶带取少许菌丝贴于载玻片,于显微镜下观察鉴定菌落及菌丝、孢子形态,行传统形态学鉴定丝状真菌菌属。

**1.3.2 DNA 分子生物学检测** 根据试剂盒说明书提取真菌 DNA,采用通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增,引物序列 ITS1 正向:5'-TCCGTACT-GAAGCTGCGG-3',ITS4 反向:5'-TCCTCGCGT-TATTCATATGC-3';PCR 反应体系:正向、反向引物各 1 μL,DNA 模板 2 μL,2×easy Taq Super Mix 13 μL,ddH<sub>2</sub>O 8 μL,总体积 25 μL;反应条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,循环 30 次;结束后取 5 μL PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳观察目的片段,测定核酸序列,将测定结果与 Genbank 数据库序列进行比对鉴定丝状真菌。

**1.3.3 MALDI-TOF-MS 技术鉴定** 将收集的丝状真菌菌株点种于沙氏培养基,30 ℃ 培养 24~48 h,在 1.5 mL 离心管加入无菌水 300 μL,挑取 10 mg 菌体加入混匀,再加入无水乙醇 900 μL,均匀,13 000 r/min 离心 2 min,弃上清,室温静置 2 min 待菌体完全干燥;加入 70%甲酸溶液,吹打混匀沉淀,室温静置 2 min,加入乙腈,混匀离心 2 min,取上清液 1 μL 点于靶板,晾干,加入基质溶液 1 μL 覆盖,晾干,将靶板放入质谱仪进行鉴定。使用 MALDI Biotyper3.0 系统进行数据库比对,分析鉴定结果。鉴定标准<sup>[6]</sup>:鉴定得分>1.7 分表示准确鉴定到种水平,1.5~1.7 分表示鉴定到属水平,<1.5 分表示无鉴定结果。每株菌点 3 个靶点,行平行检测,取得分最高点计入数据统计。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析,检出率、符合率等计数资料采用  $n(\%)$  表示,行  $\chi^2$  检验, $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

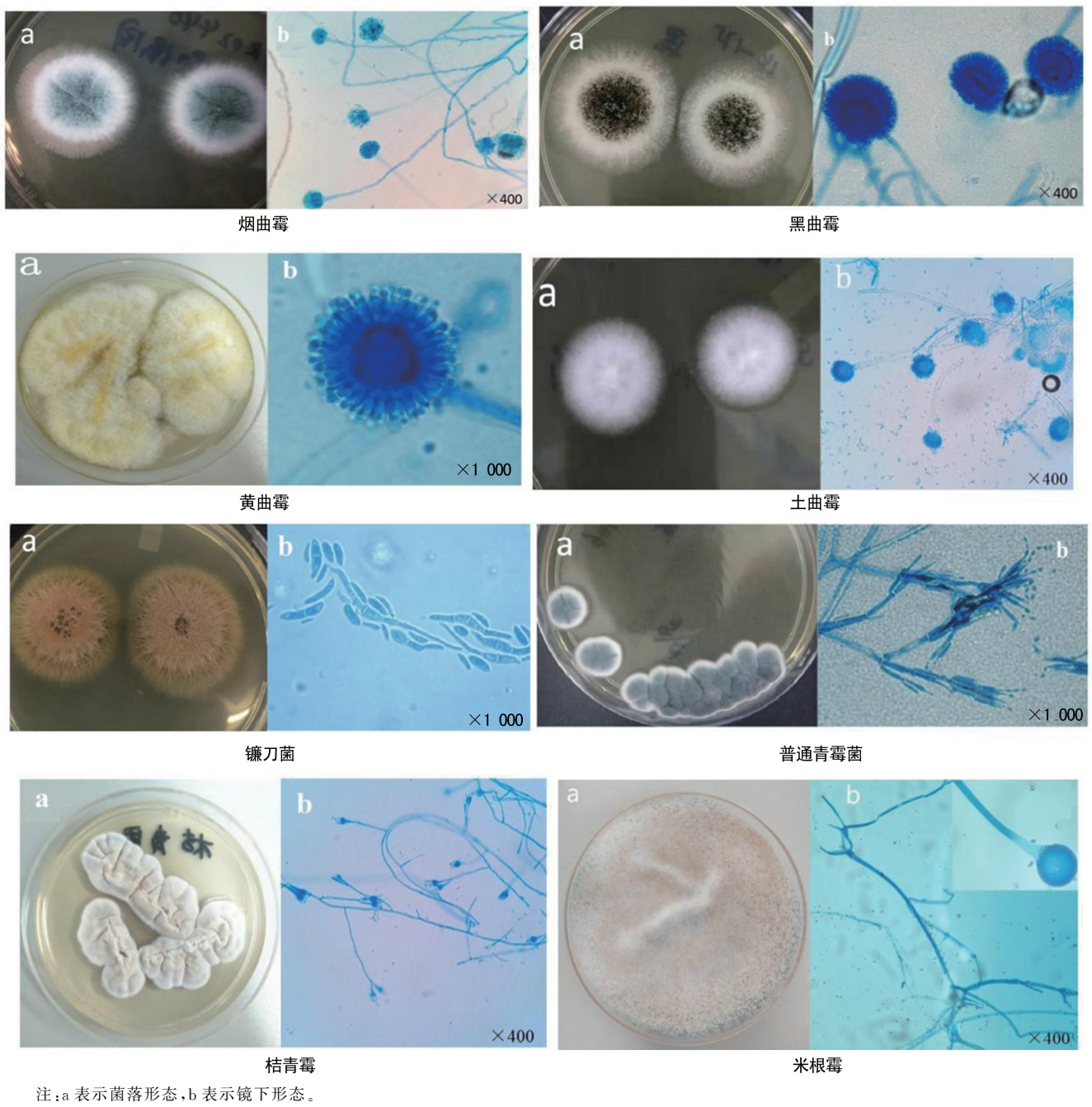
## 2 结果

**2.1 菌株来源及种类分布** 研究收集到临床标本分离的丝状真菌 230 株,包括曲霉菌属 183 株(79.6%)、青霉菌属 23 株(10.0%)、镰刀菌属 13 株(5.7%)、根毛霉 3 株(1.3%)、石膏样小孢子菌 6 株(2.6%)、米根霉 2 株(0.9%),曲霉菌属以烟曲霉、黄曲霉和黑曲霉为主。丝状真菌主要来源于痰液及肺泡灌洗液标本共有 205 株(89.1%),其次为角膜分泌物和耳道分泌物;痰液中分离最多的是曲霉菌属,其次为青霉菌属;镰刀菌属可见于多种标本,具体菌株

来源及种类分布见表 1。

2.2 传统形态学鉴定结果 经传统形态学鉴定菌落形态,综合镜检结果,准确鉴定到种水平的有 159 株(69.1%),鉴定到属水平的有 71 株(30.9%);传统形

态学在烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉等常见曲霉菌中可鉴定到种水平,对于少见曲霉及青霉菌属、镰刀菌属、根毛霉、米根霉等仅鉴定到属水平,见表 2。常见丝状真菌菌落形态及镜下形态见图 1。



注:a 表示菌落形态,b 表示镜下形态。

图 1 常见丝状真菌菌落形态及镜下形态

表 1 230 例丝状真菌菌种来源及分布[n(%)]

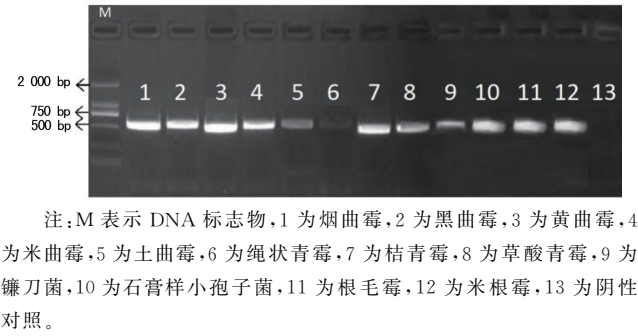
| 真菌种类 | 痰液        | 肺泡灌洗液   | 角膜分泌物  | 耳道分泌物  | 伤口分泌物  | 合计        |
|------|-----------|---------|--------|--------|--------|-----------|
| 曲霉菌属 |           |         |        |        |        |           |
| 烟曲霉  | 104(45.2) | 13(5.7) | 0(0.0) | 0(0.0) | 0(0.0) | 117(50.9) |
| 黄曲霉  | 22(9.6)   | 3(1.3)  | 6(2.6) | 3(1.3) | 0(0.0) | 34(14.8)  |
| 黑曲霉  | 7(3.0)    | 0(0.0)  | 0(0.0) | 5(2.2) | 0(0.0) | 12(5.2)   |
| 土曲霉  | 6(2.6)    | 0(0.0)  | 0(0.0) | 0(0.0) | 0(0.0) | 6(2.6)    |

续表 1 230 例丝状真菌菌种来源及分布[n(%)]

| 真菌种类    | 痰液        | 肺泡灌洗液    | 角膜分泌物   | 耳道分泌物  | 伤口分泌物  | 合计         |
|---------|-----------|----------|---------|--------|--------|------------|
| 米曲霉     | 5(2.2)    | 0(0.0)   | 0(0.0)  | 0(0.0) | 0(0.0) | 5(2.2)     |
| 其他曲霉    | 9(3.9)    | 0(0.0)   | 0(0.0)  | 0(0.0) | 0(0.0) | 9(3.9)     |
| 青霉菌属    |           |          |         |        |        |            |
| 绳状青霉    | 6(2.6)    | 0(0.0)   | 0(0.0)  | 0(0.0) | 0(0.0) | 6(2.6)     |
| 桔青霉     | 10(4.4)   | 0(0.0)   | 0(0.0)  | 0(0.0) | 0(0.0) | 10(4.4)    |
| 草酸青霉    | 7(3.0)    | 0(0.0)   | 0(0.0)  | 0(0.0) | 0(0.0) | 7(3.0)     |
| 镰刀菌属    |           |          |         |        |        |            |
| 串珠镰刀菌   | 0(0.0)    | 2(0.9)   | 2(0.9)  | 0(0.0) | 2(0.9) | 6(2.6)     |
| 轮状镰刀菌   | 0(0.0)    | 2(0.9)   | 1(0.4)  | 0(0.0) | 2(0.9) | 5(2.2)     |
| 层生镰刀菌   | 0(0.0)    | 1(0.4)   | 1(0.4)  | 0(0.0) | 0(0.0) | 2(0.9)     |
| 石膏样小孢子菌 | 3(1.3)    | 0(0.0)   | 1(0.4)  | 0(0.0) | 2(0.9) | 6(2.6)     |
| 根毛霉     | 1(0.4)    | 2(0.9)   | 0(0.0)  | 0(0.0) | 0(0.0) | 3(1.3)     |
| 米根霉     | 1(0.4)    | 1(0.4)   | 0(0.0)  | 0(0.0) | 0(0.0) | 2(0.9)     |
| 合计      | 181(78.7) | 24(10.4) | 11(4.8) | 8(3.5) | 6(2.6) | 230(100.0) |

**2.3 DNA 测序分析与 MALDI-TOF-MS 技术鉴定结果** 提取培养菌株 DNA 后行 PCR 扩增,电泳结果见图 2。230 株丝状真菌经 DNA 测序分析鉴定到种水平的准确率为 100.0%。MALDI-TOF-MS 技术鉴定根据不同菌种特有的质谱峰,结果显示,鉴定到丝状真菌种水平的有 204 株(88.7%),主要为曲霉菌属和镰刀菌属;鉴定到属水平的有 26 株(11.3%),主要为青霉菌属、根毛霉、米根霉等及其他曲霉属。MALDI-TOF-MS 技术鉴定丝状真菌曲霉菌属中烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉及镰刀菌属到种水平的准确率高达 100.0%,与 DNA 测序方法结果符合一致;鉴定青霉菌、根毛霉、米根霉、石膏样小孢子菌仅到属水平,不

同鉴定方法结果见表 2。



注:M 表示 DNA 标志物,1 为烟曲霉,2 为黑曲霉,3 为黄曲霉,4 为米曲霉,5 为土曲霉,6 为绳状青霉,7 为桔青霉,8 为草酸青霉,9 为镰刀菌,10 为石膏样小孢子菌,11 为根毛霉,12 为米根霉,13 为阴性对照。

图 2 丝状真菌 PCR 扩增电泳图

表 2 230 株丝状真菌传统形态学、MALDI-TOF-MS 技术、DNA 测序鉴定分析比较

| 菌株    | 株数(n) | 传统形态学[n(%)] |          | MALDI-TOF-MS 技术[n(%)] |         | DNA 测序<br>[n(%)] | 质谱与测序<br>符合率(%) |
|-------|-------|-------------|----------|-----------------------|---------|------------------|-----------------|
|       |       | 种水平         | 属水平      | 种水平                   | 属水平     |                  |                 |
| 曲霉菌属  | 183   | 159(69.1)   | 24(10.4) | 180(78.3)             | 3(1.3)  | 183(79.6)        | 98.4            |
| 烟曲霉   | 117   | 108(47.0)   | 9(3.9)   | 117(54.4)             | 0(0.0)  | 117(50.9)        | 100.0           |
| 黄曲霉   | 34    | 31(13.5)    | 3(1.3)   | 34(14.8)              | 0(0.0)  | 34(14.8)         | 100.0           |
| 黑曲霉   | 12    | 12(5.2)     | 0(0.0)   | 12(5.2)               | 0(0.0)  | 12(5.2)          | 100.0           |
| 土曲霉   | 6     | 2(0.8)      | 4(1.7)   | 5(2.2)                | 1(0.4)  | 6(2.6)           | 83.3            |
| 米曲霉   | 5     | 2(0.8)      | 3(1.3)   | 4(1.7)                | 1(0.4)  | 5(2.2)           | 80.0            |
| 其他曲霉  | 9     | 4(1.7)      | 5(2.2)   | 8(3.5)                | 1(0.4)  | 9(3.9)           | 88.9            |
| 青霉菌属  | 23    | 0(0.0)      | 23(10.0) | 8(3.5)                | 15(6.5) | 23(10.0)         | 34.8            |
| 绳状青霉  | 6     | 0(0.0)      | 6(2.6)   | 0(0.0)                | 6(2.6)  | 6(2.6)           | 0.0             |
| 桔青霉   | 10    | 0(0.0)      | 10(4.4)  | 8(3.5)                | 2(0.8)  | 10(4.4)          | 80.0            |
| 草酸青霉  | 7     | 0(0.0)      | 7(3.0)   | 0(0.0)                | 7(3.0)  | 7(3.0)           | 0.0             |
| 镰刀菌属  | 13    | 0(0.0)      | 13(5.7)  | 13(5.7)               | 0(0.0)  | 13(5.7)          | 100.0           |
| 串珠镰刀菌 | 6     | 0(0.0)      | 6(2.6)   | 6(2.6)                | 0(0.0)  | 6(2.6)           | 100.0           |

续表 2 230 株丝状真菌传统形态学、MALDI-TOF-MS 技术、DNA 测序鉴定分析比较

| 菌株      | 株数(n) | 传统形态学[n(%)] |          | MALDI-TOF-MS 技术[n(%)] |          | DNA 测序<br>[n(%)] | 质谱与测序<br>符合率(%) |
|---------|-------|-------------|----------|-----------------------|----------|------------------|-----------------|
|         |       | 种水平         | 属水平      | 种水平                   | 属水平      |                  |                 |
| 轮状镰刀菌   | 5     | 0(0.0)      | 5(2.2)   | 5(2.2)                | 0(0.0)   | 5(2.2)           | 100.0           |
| 层生镰刀菌   | 2     | 0(0.0)      | 2(0.8)   | 2(0.8)                | 0(0.0)   | 2(0.8)           | 100.0           |
| 石膏样小孢子菌 | 6     | 0(0.0)      | 6(2.6)   | 3(1.3)                | 3(1.3)   | 6(2.6)           | 50.0            |
| 根毛霉     | 3     | 0(0.0)      | 3(1.3)   | 0(0.0)                | 3(1.3)   | 3(1.3)           | 0.0             |
| 米根霉     | 2     | 0(0.0)      | 2(0.8)   | 0(0.0)                | 2(0.8)   | 2(0.9)           | 0.0             |
| 合计      | 230   | 159(69.1)   | 71(30.9) | 204(88.7)             | 26(11.3) | 230(100.0)       | —               |

注：—表示无数据。

**2.4 传统形态学、DNA 测序与 MALDI-TOF-MS 技术鉴定结果比较** 以 DNA 测序结果为准, MALDI-TOF-MS 技术鉴定到丝状真菌种水平的准确率为 88.7%(204/230)显著高于传统形态学鉴定的 69.1%(159/230); 鉴定到属水平的准确率为 11.3%(26/230), 显著低于传统形态学鉴定的 30.9%(71/230), 差异有统计学意义( $\chi^2=26.455, P<0.001$ )。

3 讨 论

近年来, 临床真菌感染病例越来越多, 由其引起的病死率也逐渐增高, 与抗真菌治疗延迟密切相关。丝状真菌是临床常见且特殊的真菌种类, 其种类多, 分类复杂, 不同种属菌株耐药不同, 对一线抗真菌药物反映效果不同<sup>[6]</sup>。据相关研究报道, 由曲霉、镰刀菌等丝状真菌引起的深部感染近年明显增多, 抗真菌药物治疗使得耐药病原菌数量、种类明显增加; 丝状真菌感染病原菌分布呈现烟曲霉感染比例下降, 非烟曲霉和非曲霉丝状真菌感染比例增加的特点, 甚至在某些特定人群中感染率超过酵母菌<sup>[7-8]</sup>。所以, 快速准确的鉴定临床真菌种属水平对针对性指导临床用药, 降低无效用药率至关重要。

目前, 对于丝状真菌的鉴定因其复杂的形态特征及丝状真菌菌株表型特征多变, 传统形态学鉴定使得形态学上很难区别的相似菌株鉴定得到准确结果, 限制了深部真菌感染的早期诊断及治疗<sup>[9]</sup>。而基因序列分析技术用于微生物菌株鉴定准确率高, 被认为是“金标准”, 但其对检测环境及设备、人员要求较高, 操作复杂、成本高, 不能作为临床鉴定的常规方法。MALDI-TOF-MS 技术是近年广泛用于临床微生物病原菌鉴定的新型软电离质谱技术, 其通过检测微生物蛋白质指纹图谱, 根据不同菌种特有的质谱峰与质谱图数据库中特征性谱图进行比对, 进而快速得出微生物鉴定结果, 在细菌同源性分析、病原菌分型、毒力因子鉴定及耐药检测等方面表现出优势<sup>[10-12]</sup>。目前, MALDI-TOF-MS 技术在细菌中的鉴定应用相对成熟, 在临床微生物的快速鉴定中, 近年张霄霄等<sup>[13]</sup>发现 MALDI-TOF-MS 技术将酵母样真菌的鉴定率从传统形态学的 79.58% 提高至 95.07%。HANDAL

等<sup>[14]</sup>报道, 与 16s rDNA 相比, MALDI-TOF-MS 技术鉴定 197 株临床分离厌氧菌的准确率达 94.9%。SLEIMAN 等<sup>[15]</sup>报道, 结合德国布鲁克基质辅助激光解析电离飞行时间质谱丝状真菌数据库和实验室自建 18 种曲霉谱图, 将曲霉种水平鉴定率提高了 24%。MCMULLEN 等<sup>[16]</sup>采用 VITEK 质谱基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定 144 株曲霉种水平的鉴定率达 93.6%, 对传统形态学仅鉴定到属水平的曲霉菌株均实现了种水平鉴定。另张伟铮等<sup>[17]</sup>报道, MALDI-TOF-MS 技术对曲霉菌属、毛霉菌属、毛癣菌属及毛孢子菌属等丝状真菌的鉴定率达 96.5%~100.0%, 对丝状真菌鉴定的总体准确率为 86.36%, 与内部转录间隔区测序分析符合率为 83.97%。张素婷等<sup>[18]</sup>对临床常见真菌鉴定准确性的 Meta 分析发现, MALDI-TOF-MS 技术鉴定真菌合并灵敏度为 97%, 合并特异度为 85%, 受试者工作特征曲线下面积为 0.908, 其对临床酵母菌属及丝状菌属的鉴定不受菌株来源及仪器等影响, 鉴定效果较高。提示 MALDI-TOF-MS 技术在临床真菌鉴定中的作用日益显著, 然其应用缺少实践和经验积累, 尤其丝状真菌结构复杂, 鉴定过程复杂, 现阶段研究报道鲜少, 目前仍处于不断探索阶段。本研究从临床共分离出 230 株丝状真菌, 结合传统形态学鉴定和 DNA 测序分析显示, 以 DNA 测序结果为准, MALDI-TOF-MS 技术鉴定丝状真菌到种水平的准确率为 88.7%, 明显高于传统形态学鉴定的 69.1%( $\chi^2=26.455, P<0.001$ ), 发现传统形态学仅对常见曲霉菌属的鉴定率较高, 尤对菌落形态及镜下形态相近的菌株鉴定较困难; MALDI-TOF-MS 技术对曲霉菌属中烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉和镰刀菌属鉴定到种水平的准确率高达 100.0%, 与 DNA 测序方法结果符合一致, 而对青霉菌、根毛霉、米根霉等仅鉴定到属水平, 低于传统形态学鉴定的属水平, 与既往相关报道结果近似, 提示 MALDI-TOF-MS 技术能快速准确的鉴定大多数丝状真菌到种水平, 可用于实验室常规鉴定临床真菌的有效补充方法以提高真菌种水平的鉴定, 为临床指导用药治疗提供价值参考。

现阶段, MALDI-TOF-MS 技术在临床真菌鉴定方面表现出广阔的应用前景, 而其鉴定丝状真菌较滞后的原因在于, 一是质谱技术主要分析的是胞内核糖体蛋白成分, 丝状真菌细胞壁厚且坚韧的特性使得质谱分析不易获得高质量的质谱图谱; 同时丝状真菌菌丝和孢子两种细胞成分的质谱峰图存在差异<sup>[19-20]</sup>。近年, 国际上相继开展了大量关于 MALDI-TOF-MS 技术鉴定丝状真菌最佳实验条件的相关研究, 指出 MALDI-TOF-MS 技术鉴定丝状真菌的最佳培养基为沙氏葡萄糖液体培养基, 培养时间为 24 h, 并指出采用甲酸-乙腈提取法用于质谱分析前处理有助于破坏细胞壁, 进一步释放胞内核糖体蛋白, 获取高质量质谱峰图<sup>[20]</sup>。本研究 MALDI-TOF-MS 技术鉴定丝状真菌条件优化, 结果显示, MALDI-TOF-MS 技术能有效提高丝状真菌鉴定率, 作为传统形态学鉴定的有力补充可应用于临床实验室, 是一种快速、高效的鉴定手段。二是数据库的局限性, 现有临床常见病原真菌质谱鉴定数据库涵盖范围不够完善, 且由于不同地区鉴定效能在同一数据库存在差异, 及少数临床真菌缺乏特异性峰值导致其不能鉴定得出<sup>[21]</sup>。另外 MALDI-TOF-MS 技术对临床真菌耐药性检测尚未取得突破性进展等均是影响该技术在临床真菌鉴定中广泛应用的主要原因。因此, 进一步优化质谱分析前处理, 继续更新补充数据库参考菌种数量, 提高 MALDI-TOF-MS 技术鉴定效能, 将在临床真菌的快速鉴定中发挥更重要的作用。

综上所述, MALDI-TOF-MS 技术鉴定临床丝状真菌符合率高, 快速、准确且操作便捷, 可作为临床真菌实验室鉴定的有效补充手段, 为真菌鉴定提供了新的选择。

## 参考文献

- [1] 徐媛, 陈敏, 廖万清. 中国侵袭性曲霉病流行病学现状[J]. 中国真菌学杂志, 2018, 13(1): 57-60.
- [2] 何小羊, 任秋霞, 杨英. 2008—2017 年我国深部真菌病原谱及流行特征国内文献系统分析[J]. 中国真菌学杂志, 2018, 13(4): 229-234.
- [3] 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.
- [4] 张嵘. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在临床微生物检验中的应用与发展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(6): 703-708.
- [5] 余菁, 马越娥, 史玉玲. 真菌感染检测方法的研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2017, 12(4): 252-256.
- [6] 彭阳, 许超, 王玉月, 等. 丝状真菌的快速鉴定及药敏试验[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(7): 486-490.
- [7] 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.
- [8] ZHOU L, CHEN Y, XU Y. Performance of VITEK mass

- spectrometry (V3. 0) for rapid identification of clinical *Aspergillus fumigatus* indifferent culture conditions on the base of ribosomal protein[J]. Infect Drug Resist, 2017, 10(2): 499-506.
- [9] 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.
- [10] JANG K S, KIM Y H. Rapid and robust MALDI-TOF-MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications[J]. J Microbiol, 2018, 56(4): 209-216.
- [11] 范行良, 杨明, 陈天游, 等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱原理及其在微生物研究中的应用[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(24): 2969-2973.
- [12] 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.
- [13] 张霄霄, 汪定成, 戈伟, 等. MALDI-TOF-MS 技术在酵母样真菌鉴定中的临床应用评价[J]. 中国真菌学杂志, 2016, 11(5): 285-288.
- [14] HANDAL N, JORGENSEN S B, TUNSTO H S, et al. Anaerobic blood culture isolates in a Norwegian university hospital: identification by MALDI-TOF-MS vs 16S rRNA sequencing and antimicrobial susceptibility profiles[J]. APMIS, 2015, 123(9): 749-758.
- [15] SLEIMAN S, HALLIDAY C L, CHAPMAN B, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of *Aspergillus*, *Scedosporium*, and *Fusarium* spp. in the Australian clinical setting[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(8): 2182-2186.
- [16] MCMULLEN A R, WALLACE M A, PINCUS D 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.
- [17] 张伟铮, 关文苑, 李松, 等. ITS 序列分析与 MALDI-TOF-MS 质谱技术在丝状真菌鉴定中的应用[J]. 菌物学报, 2019, 38(8): 1298-1305.
- [18] 张素婷, 张涛, 黄健, 等. MALDI-TOF-MS 对临床常见真菌鉴定准确性的 Meta 分析[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(7): 625-632.
- [19] 叶丽艳, 郭玲, 马艳宁, 等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术在快速鉴定真菌中的临床应用研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(15): 3361-3363.
- [20] 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.
- [21] 田月如, 关明, 李敏. MALDI-TOF-MS 技术在临床微生物诊断应用中的挑战[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(8): 559-562.