

无义变异 c. 2941G>T p. Glu981Ter, 可导致蛋白质编码提前终止。基于以上几点, 该患儿可明确诊断为 DMD。但该患儿确诊耗时近 6 个月时间, 主要原因可能有以下几方面原因: (1) 家庭重视不够: 患儿平常身体无明显不适, 但走路易疲劳, 仰卧需单手撑地才能站立等症状早有出现, 但患儿年龄尚小, 被认为发育迟, 并未考虑存在疾病而被忽视未就医; (2) 临床医生经验不足: 该患儿因体检发现肝功能异常入院, 一段时间仅关注肝脏功能及相关检查较为局限, 加之巨细胞病毒阳性, 而忽略其他如心肌酶谱、体格检查等; (3) 患儿运动发育基本正常, 会独立行走; (4) 无特殊家族史, 其同母哥哥体健。这些原因均导致了该患儿疾病的延迟确诊。

DMD 遗传方式为 X 连锁隐性遗传, 发病率在各国、地区和人种间无明显差异, 每 3 600~6 000 例出生男婴中有 1 例发病。中国的发病率约为 1/3 853, 估算全国患者约 70 000 人^[4]。该病常于 2~5 岁起病, 常于 20 岁左右死于心力衰竭或呼吸功能不全^[5]。该病在诊疗过程中重点要与其他类型肌营养不良、脊肌萎缩症、炎性肌病和代谢性肌病进行鉴别诊断, 但通过临床表现、血肌酶、肌肉活检和基因检测能够进行鉴别^[4]。

DMD 基因主要有 3 种突变类型^[6-8]: (1) 大片段缺失型: 最为常见, 突变发生频率约占所有突变的 60%; (2) 大片段重复型: 较少见, 约占所有突变的 10%; (3) 微小突变: 包括单个或数个核苷酸置换、缺失或插入等, 约占所有突变的 30%。本病例应用 MLPA 技术检测大片段缺失和大片段重复, 结合二代测序技术对 DMD 基因外显子及周围内含子进行微小突变分析。能够明确病因, 但目前尚无有效的治疗方法。对其鉴别诊断, 对患者的康复治疗有一定的指导作用, 同时, 能够提供一定的遗传咨询与指导。

• 个案分析 •

通过对本例 DMD 的确诊, 提示临床在诊疗过程中, 对不明原因的肝功能异常, 且经抗病毒、护肝等治疗无效者, 要加强体格检查及其他辅助检查, 如血清肌酶、心电图及肌活检, 必要时行基因检测, 提高罕见病的诊疗水平。

参考文献

- [1] BIRNKRANT D J, BUSHBY K, BANN C M, et al. Diagnosis and management of duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management [J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17(3): 251-267.
- [2] BAXTER P. Diagnosis and management of duchenne muscular dystrophy [J]. *Dev Med Child Neurol*, 2010, 52(4): 313.
- [3] 张成. 《中国假肥大型肌营养不良症诊治指南》解读 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2018, 18(07): 475-479.
- [4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 罕见病诊疗指南 (2019 年版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 627-631.
- [5] 董奇超, 陈慧敏, 金欣. Duchenne 型肌营养不良基因治疗研究进展 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2018, 20(8): 691-697.
- [6] ALMOMANI R, STOEP N, BAKKER E, et al. Rapid and cost effective detection of small mutations in the DMD gene by high resolution melting curve analysis [J]. *Neuromuscul Disord*, 2009, 19(6): 383-390.
- [7] NICO B, MARZULLO A, CORSI P, et al. A possible role of tryptase in angiogenesis in the brain of mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Neuroscience*, 2004, 123(3): 585-588.
- [8] ZHOU L, LU H. Targeting Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010, 69(8): 771-776.

(收稿日期: 2019-07-16 修回日期: 2019-10-19)

质谱快速鉴定两例 AIDS 合并真菌性血流感染病例分析

丁 宁¹, 王玉月²

(1. 常州市妇幼保健院检验科, 江苏常州 213000; 2. 常州市第一人民医院检验科, 江苏常州 213003)

关键词: 质谱鉴定; AIDS; 真菌性血流感染

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2020. 03. 035

文章编号: 1673-4130(2020)03-0382-03

中图法分类号: R512. 91; R519

文献标识码: C

获得性免疫缺陷综合征(AIDS)是由人免疫缺陷

病毒(HIV)引起的严重危害人类健康的传染病, 以损

伤免疫系统为主要特征,患者极易获得机会性感染,而新型隐球菌、马尔尼菲蓝状菌等深部真菌的机会性感染是 AIDS 患者死亡的主要原因之一^[1]。新型隐球菌最常引起的感染为隐球菌性脑膜炎,其发病隐匿、病死率高。患者主要表现为难以忍受的头痛,伴发热、恶心、呕吐,脑膜刺激征阳性等脑膜炎的症状与体征^[2]。隐球菌性脑膜炎在健康人群中很少发生,但在 AIDS 患者中发病率较高。马尔尼菲蓝状菌是一种条件性高致病性真菌,同时也是青霉菌属中唯一的双向真菌,主要侵袭免疫低下的人群,尤其是 AIDS 患者。其临床表现复杂多样且缺乏特异性,有文献报道,85%的马尔尼菲蓝状菌感染发生于 AIDS 患者,已成为 AIDS 临床诊断的指征性症状之一^[3]。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是一种新型软电离生物质谱技术,通过检测每种病原菌特征性的蛋白指纹图谱,并与数据库中的图谱库进行比对即可鉴定出待测病原菌。将 MALDI-TOF MS 联合分离胶促凝管直接检测血培养阳性瓶中的病原菌,可以极大地缩短检测时间^[4],为临床提供可靠的诊断依据。

本文通过回顾分析 2 例明确诊断的合并真菌感染的 AIDS 病例,探讨质谱鉴定对 AIDS 患者合并真菌感染诊断的临床价值。

1 病例资料

1.1 一般资料 2018 年 9 月常州市第一人民医院呼吸科及血液科收治的 2 例合并真菌感染的 HIV 患者。病例 1,男,56 岁,因“咳嗽伴乏力、纳差半月余”入院。患者入院前 1 月无诱因出现阵发性咳嗽,1 周前至当地医院就诊查胸片提示支气管炎,予“顺尔宁、苏黄止咳胶囊”,症状无改善,后出现乏力、纳差进行性加重。2 d 前进食后呕吐少许胃内容物,于本院门诊就诊并行相关检查。患者自述自起病来进食逐步减少,体质量减轻约 5 kg。患者神志清,精神萎,慢性病面容。胸部 CT 示右肺下叶多发空腔性病变,多发肺大疱伴感染,右肺下叶外基底段结节,右肺上叶后段少许炎症,左肺多发纤维灶。病程中患者出现一次发作性双眼上翻,持续数秒后好转;嗜睡,呼之睁眼,颈部稍有抵抗。诊断为:肺部阴影;真菌感染可能;脑炎(真菌性可能)。病例 2,女,39 岁,因“发现锁骨上淋巴结肿大 2 周余”入院。患者 2 周前无明显诱因发现左侧锁骨上淋巴结酸痛肿大,伴有咳嗽、咳痰、发热,并感全身乏力、头晕不适。患者病程中有晕厥 1 次,约 15 s 后意识恢复。患者体温 39 ℃,神志清,精神萎。正电子发射计算机断层显像示多发淋巴结氟代脱氧葡萄糖代谢增高,考虑淋巴瘤浸润;左上肺磨

玻璃影结节氟代脱氧葡萄糖代谢增高;两肺局部轻度炎症,右中肺微小结节。诊断为:淋巴结肿大待查、肺部感染。

1.2 MALDI-TOF MS 鉴定 抽取 5 mL 阳性血培养液注入分离胶促凝管,需氧瓶抽取的血培养液以 4 000 r/min 离心 10 min,厌氧瓶中抽取的培养液经 3 500 r/min 离心 7 min,分离待测病原菌。弃去分离胶促凝管内上层液体,缓慢注入 1 mL 无菌蒸馏水将待测菌沉淀混悬(不破坏促凝胶),将混悬液转移至无菌 1.5 mL 小型离心管中,经 13 000 r/min 离心 1 min。弃去上清液后重复洗涤一次,最后将离心后管底的细菌混悬于 1 mL 无菌蒸馏水中待检。取 300 μ L 待测菌重悬液与 900 μ L 无水乙醇混合,经 13 000 r/min 离心 1 min 后弃去上清液,再经多次离心以完全去除残留的无水乙醇,放置于空气中自然干燥。加入 70% 甲酸 30 μ L 使待测菌充分混匀,再加入乙腈 30 μ L 旋涡混匀,经 13 000 r/min 离心 2 min,取上清液用于 MALDI-TOF MS 鉴定。取制备好的上清液 1 μ L 涂布于 96 孔金属靶板,室温干燥后在金属靶板表面加入基质液 α -氰-4-羟基肉桂酸 1 μ L,再次室温干燥后进行检测。参数设置:线性,正离子,蛋白峰谱 m/z 范围 $2 \sim 20 \times 10^3$,激光解析每孔 100 次。应用 Biotyper 3.0 统进行数据库比对,得出鉴定结果。

1.3 API 20 C 板条鉴定 抽取血培养瓶中的培养液进行纯培养,将分离到的菌落用无菌生理盐水配制成 2 个麦氏单位待测菌悬液,取 100 μ L 悬液至 API C Medium 培养基中,混匀后加入鉴定板条,28 ℃ 培养 72 h 后进行结果判读。

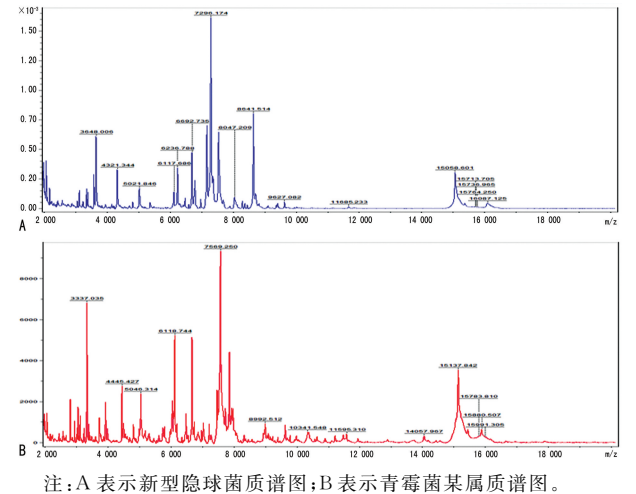
1.4 真菌小培养 将马铃薯葡萄糖琼脂培养基切割成小块置于载玻片上,用接种环挑取纯培养的丝状真菌接种于培养基的四角,盖上盖玻片,28 ℃ 培养 2~3 d 后用乳酸棉兰酚染色,于高倍镜下观察真菌形态。

2 结果

2.1 质谱鉴定结果 2 例患者均在入院后送检血培养,在血培养报阳后直接用质谱仪进行检测。病例 1 鉴定结果为新型隐球菌,质谱评分为 2.142。病例 2 鉴定结果为青霉菌属某些种,质谱评分为 1.474。见图 1。

2.2 传统鉴定结果 病例 1:患者血培养双侧需氧瓶分别于 67、70 h 报警阳性,涂片革兰染色镜检找到正圆形的芽生孢子。将标本接种在血琼脂平板、巧克力琼脂平板及沙保弱培养基上,35 ℃ 48 h 培养均长出白色光滑酵母样菌落。经 API 20 C 板条鉴定为新型隐球菌。见图 2。病例 2:患者血培养双侧需氧瓶分

别于 77、89 h 报警阳性，涂片革兰染色找到丰富的菌丝及少量真菌孢子，孢子两头钝圆、中间有隔的腊肠形。将标本接种在血琼脂平板、巧克力琼脂平板及沙保弱培养基上，分别于 28℃ 和 35℃ 孵育 48 h，血平板上可见灰白色腊样、膜状平坦菌落，菌落中央可见脐状凹陷；35℃ 培养的沙保弱斜面上可见白色酵母样菌落，不产生红色色素。28℃ 培养的沙保弱斜面上可见淡红色绒毛状菌落，整个培养基被染成玫瑰红色。真菌小培养后可见分枝分隔菌丝，分生孢子梗光滑，呈帚状枝分散，多为对称双轮生；梗基上有 3~6 个瓶梗，顶端变窄。通过培养的双相性以及帚状枝形态可鉴定为马尔尼菲蓝状菌。见图 2、3。



10 d^[7],采用质谱快速鉴定的方法当天即可给出该真菌属的初步鉴定结果,且检测结果与传统真菌培养的结果相符合,极大地减少了花费在真菌鉴定上的时间成本^[10-11]。虽然对青霉菌只能鉴定到属的水平,仍需结合经典的真菌培养及形态学观察才能鉴定到种的水平,但这无疑可以为临床诊疗争取到更多的时间。此外,相较于传统真菌鉴定方法,使用质谱仪直接鉴定血培养阳性瓶中的真菌操作更加简单,且易于制定标准化操作流程,从而可以减少人为因素造成的鉴定误差。

综上所述,AIDS 患者易合并条件致病性真菌的感染,真菌感染的诊断依赖病原学鉴定。传统形态学鉴定对于真菌感染的诊断有重要意义,但其耗时较长,而质谱技术的出现简化了操作流程,缩短了鉴定时间,为临床真菌感染的治疗赢得了时间。提高对不明原因发热或感染患者的血培养送检率,尽早查找病原菌并及时对症治疗,结合新兴的质谱技术缩短病原菌检测时间,为临床诊断提供更加及时可靠的依据。

参考文献

[1] 魏沙沙. 艾滋病合并马尔尼菲青霉菌病患者临床特点及药敏试验的研究[D]. 昆明:昆明医科大学,2016.

[2] 王云灿,何俊瑛,卜晖,等. 新型隐球菌性脑膜炎[J]. 中国现代神经疾病杂志,2013,13(1):16-23.

[3] 蔡琳,周锐峰,朱迎春,等. 艾滋病合并马尔尼菲青霉菌病

17 例临床分析[J]. 现代预防医学,2012,39(22):6051-6053.

[4] 盛微翔,吴亮,史伟峰,等. 分离胶促凝管联合 MALDI-TOF MS 快速检测血培养阳性瓶中细菌的探讨[J]. 现代诊断与治疗,2017,28(22):4117-4119.

[5] 谢朝云,熊芸,孙静,等. 艾滋病住院患者真菌感染的影响因素[J]. 中国感染控制杂志,2017,16(7):643-646.

[6] 麦玉珍,李蹕,占婷婷. 艾滋病合并隐球菌脑膜炎的预后因素分析[J]. 现代医院,2017,17(6):855-858.

[7] 张坚生,洪文昕,李凌华,等. 艾滋病合并马尔尼菲青霉菌病死亡病例 27 例回顾性分析[J]. 实用医学杂志,2014,30(13):2108-2110.

[8] 廖晚珍,彭卫华,胡雪飞,等. 艾滋病合并马尔尼菲青霉菌病与恶性淋巴瘤的报道[J]. 中华医院感染学杂志,2008(7):1038-1040.

[9] 刘正印,王贵强,朱利平,等. 隐球菌性脑膜炎诊治专家共识[J]. 中华内科杂志,2018,57(5):317-323.

[10] 宋启飞,刘敏雪,李梦娇,等. 质谱快速鉴定血培养阳性标本的方法研究[J]. 中国现代医学杂志,2018,28(35):29-32.

[11] 李媛睿,陈峰,皇甫显婵,等. 基于基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪快速鉴定结果的阳性血培养中常见细菌直接药物敏感性试验的评估[J]. 诊断学理论与实践,2016,15(1):28-34.

(收稿日期:2019-07-17 修回日期:2019-10-18)

(上接第 379 页)

教学改革与体会[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(12):1621-1622.

[2] 张传标,路学一. 当前国内外医学教学改革现状比较分析[J]. 医学教育管理,2015,1(3):174-178.

[3] 彭小青,沈守荣,张浩,等. “互联网+”模式在医学教育中的应用研究[J]. 中华医学教育探索杂志,2017(8):846-851.

[4] 唐群,张熙,雷久士,等. 互联网在病理学教学中的应用[J]. 中华医学教育杂志,2011,31(2):252-253.

[5] 俞伟,胡振宇,冯磊,等. “互联网+教育”在医学实践教学中的应用[J]. 医学信息学杂志,2017,39(4):89-94.

[6] 王凤杰,陈显兵,谭刚,等. 互联网+医学形态学实践教学模式的改革与思考[J]. 中国医药指南,2018,16(24):296-297.

[7] 辛雪,纳仁高娃. “微信公众平台+问卷星”在生理学教学中的应用[J]. 医学教育研究与实践,2017,25(3):428-430.

[8] 张艳,徐海,刘利梅,等. 基于“问卷星”的病理生理学过程考核体系改革的探索[J]. 中华医学教育杂志,2018,38(3):384.

[9] 王恬,康琳琳,吴梦晓,等. 我国医学类慕课课程建设的现

状调查[J]. 中华护理教育,2018,15(1).

[10] 唐甜甜,张蕴莉,刘永伟,等. 慕课在《临床生物化学检验》教学中的探究[J]. 中国继续医学教育,2016,8(15):15-17.

[11] 莫武宁,李山,林发全,等. LBL+小组合作学习教学在临床血液学检验教学中的效果评价[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(9):1288-1289.

[12] 曾婷婷,毛志刚,张春莹,等. 四年制医学检验技术专业《临床基础检验学》课程改革探索[J]. 检验医学与临床,2016,13(2):368-369.

[13] 曾婷婷,郑沁,金咏梅,等. 构建多元化教学模式提升医学检验学生综合素质[J]. 检验医学与临床,2015(15):2291-2293.

[14] 曾婷婷,郑沁,金咏梅,等. 应用病例教学和 CTDI-CV 量表对医学检验专业学生评判性思维的训练和培养[J]. 检验医学与临床,2013(21):2903-2904.

[15] 金胜,代婧,滕旭,等. 基于互联网+的形成性评价体系在医学生理学教学中的构建[J]. 基础医学教育,2017,19(8):620-622.

(收稿日期:2019-07-18 修回日期:2019-11-25)