

• 论 著 •

MALDI-TOF MS 自建库在红色毛癣菌感染中的临床快速诊断价值*

邓穗燕¹, 易江华², 蔡文莹³, 夏 勇^{1△}

(广州医科大学附属第三医院: 1. 检验科; 2. 皮肤科, 广东广州 510150;

3. 中山大学孙逸仙纪念医院皮肤科, 广东广州 510120)

摘要:目的 建立并评价实验室自建的红色毛癣菌基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)数据库的可行性。方法 将红色毛癣菌标准菌株 ATCC 28188 用沙保罗葡萄糖琼脂(SDA)平板 28 ℃ 培养 5 d, 分别用双甲酸夹心法和甲酸提取法作为蛋白提取方法, 利用 MALDI-TOF MS 对标准菌株进行质谱数据采集, 建立 2 种不同蛋白提取方法的菌株数据库“双甲酸夹心法自建库”和“甲酸提取法自建库”; 并用 2 种蛋白提取方法对 21 株红色毛癣菌临床分离株进行蛋白提取后, 分别选取“双甲酸夹心法自建库+Bruker 商品库”、“甲酸提取法自建库+Bruker 商品库”和“Bruker 商品库”做质谱鉴定, 从而对各数据库的鉴定效果进行评价。结果 “甲酸提取法自建库+Bruker 商品库”对 21 株红色毛癣菌临床分离株的鉴定得分显著高于其余两组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 匹配率为 21/21; “Bruker 商品数据库”与“Bruker 商品数据库+双甲酸夹心法自建库”的鉴定得分比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 本实验室建立的“甲酸提取法自建库+Bruker 库”对红色毛癣菌的鉴定能力好, 适用于临床微生物实验室。与待测菌统一培养条件所建立的数据库丰富了原有的数据库信息, 使待测菌的鉴定更为准确。双甲酸夹心法操作简便, 但对红色毛癣菌蛋白提取的效果欠佳。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 自建库; 红色毛癣菌; 鉴定

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.04.009

中图法分类号: R372

文章编号: 1673-4130(2020)04-0418-05

文献标识码: A

Diagnostic value of MALDI-TOF MS self-built library in *Trichophyton rubrum* infection*

DENG Suiyan¹, YI Jianghua², CAI Wenyong³, XIA Yong^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Ddermatology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510150, China; 3. Department of Ddermatology, Sun Yat Sen Memorial Hospital of Sun Yat Sen University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: **Objective** To establish and evaluate the feasibility of a laboratory-built matrix of *Trichophyton rubrum* matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Methods** The standard strain of *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 was cultured at 28 ℃ for 5 d on sepalol glucose agar (SDA) plate. The protein was extracted by the method of double formic acid sandwich and formic acid extraction respectively. The protein was extracted by MALDI-TOF MS was used to collect the mass spectrum data of standard strains, and two kinds of strain databases of different protein extraction methods were set up, which were "self-built library of dicarboxylic acid sandwich method" and "self-built Library of formic acid extraction method". After protein extraction of 21 clinical isolates of *Trichophyton rubrum* by two methods, we selected "self built library of dicarboxylic acid sandwich method+Bruker commercial library", "self built library of formic acid extraction method+Bruker commercial library" and "Bruker commercial library" for mass spectrometry identification, so as to evaluate the identification effect of each database. **Results** The score of "self built library of formic acid extraction method+Bruker commercial library" of 21 clinical isolates of *Trichophyton rubrum* was significantly higher than that of the other two groups ($P < 0.05$), the matching

* 基金项目: 广州医科大学附属第三医院青年科研项目(2017Q13)。

作者简介: 邓穗燕, 女, 主管技师, 主要从事临床微生物检验方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 377695944@qq.com。

本文引用格式: 邓穗燕, 易江华, 蔡文莹, 等. MALDI-TOF MS 自建库在红色毛癣菌感染中的临床快速诊断价值[J]. 国际检验医学杂志,

rate was 21/21; there was no significant difference between "Bruker commercial library" and "self built library of dicarboxylic acid sandwich method + Bruker commercial library" ($P < 0.05$). **Conclusion** The "self built library of formic acid extraction method + Bruker commercial library" by this laboratory has a good ability to identify *Trichophyton rubrum*, which is suitable for clinical microbiology laboratory. The database established by the unified culture conditions with the bacteria to be tested enriches the original database information and makes the identification of the bacteria to be tested more accurate. The double formic acid sandwich method is easy to operate, but the effect of protein extraction of *Trichophyton rubrum* is not good.

Key words: matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; self built library; *Trichophyton rubrum*; identification

红色毛癣菌是最常见的也是世界范围内传播最广的皮肤癣菌^[1],可侵犯皮肤角质层、甲板 and 毛发,导致体股癣、手足癣、甲癣和头癣等各种皮肤癣菌病。目前,国内诊断的主要依据为真菌直接镜检和培养,镜检和培养相结合的正确诊断率为 50%~75%^[2],导致 1/4~1/2 的皮肤癣菌病无法确诊,且传统的形态学鉴定方法耗时长。鉴于红色毛癣菌引起的皮肤癣菌病在皮肤病中的高发病率及它在环境中的广泛分布,有必要寻找一种临床可行的、简便快捷的鉴定方法。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是近年来发展起来的一种新兴诊断技术,其通过检测微生物的肽/蛋白质指纹图谱,经软件处理并与数据库进行比对分析,可在数分钟内完成对微生物种、属水平的鉴定^[3-4]。但由于丝状真菌菌丝难以挑取、细胞壁厚、培养条件等原因,使得质谱对丝状真菌的鉴定效果不佳^[5]。蛋白质提取及纯化的效率是上机前的主要影响因素,目前常用的方法有直涂法(包括传统直涂与改良直涂法)和甲酸提取法^[3-4],前者操作简便,对细菌蛋白提取效果好;后者是 BRUKER 公司推荐使用的标准操作方法,操作相对繁琐、耗时。商业数据库使用旋转培养法对丝状真菌进行液体培养、甲酸提取法进行前处理,而在临床工作中,待测菌是通过固体培养法所得,前处理方法使用基于改良直涂法的“双甲酸夹心法”(由于丝状真菌菌丝难以附着于靶板上,笔者在改良直涂法的基础上先加 1 μL 70%甲酸,起到黏附菌丝作用),这可能是导致实际临床应用质谱鉴定丝状真菌效果不佳的原因之一。待鉴定菌株的培养条件和前处理方法与建库菌株保持一致或许更有利于检测效率的提高^[4-6]。本研究利用固体培养法对标准菌株进行培养,用双甲酸夹心法和甲酸提取法作为蛋白提取方法,分别建立 2 个红色毛癣菌标准菌库,再以双夹心甲酸法和甲酸提取法对 21 株红色毛癣菌临床分离株进行蛋白提取和质谱鉴定,通过对 2 个自建库和商品库之间鉴定得分的比对,从而对自建库的鉴定效果进行评价。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 4—12 月广州医科大学附属第三医院皮肤科送检的“皮肤真菌培养”红色毛癣菌阳性标本作为验证菌,所有验证菌通过测序确

认为红色毛癣菌,多次送检的同一患者只收集首株菌。自建库所用标准菌株为红色毛癣菌 ATCC28188,购自中国江门市凯林贸易有限公司。

1.2 仪器与试剂 MALDI-TOF MS 购自德国 Bruker 公司;真菌培养箱购自中国上海跃进医疗器械有限公司;高速离心机购自中国北京白洋医疗器械有限公司;光学显微镜购自德国 Zeiss 公司;加样枪购自德国 Eppendorf 公司;FlexControl3.4、FlexAnalysis、MALDI Biotyper3.1 软件购自德国 Bruker 公司;乳酸酚棉蓝染液购自中国珠海贝索公司;乙腈、甲酸、三氟乙酸、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)、蛋白多肽标准品(BTS)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;无水乙醇购自广州中南化学试剂有限公司;双蒸水、菌种保存液、沙保罗葡萄糖琼脂(SDA)固体培养基购自中国江门凯林贸易有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准菌株及临床分离株的培养 将标准菌株 ATCC 28188、临床标本(皮屑、甲屑等皮肤标本)接种在 SDA 固体培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养,标准菌株 ATCC 28188 培养 5 d 建立 MALDI-TOF MS 标准数据库,用于形态学鉴定的临床标本培养 5~15 d 至成熟状态,被筛选为用于验证 MALDI-TOF MS 数据库的临床分离株复苏培养 5 d 作质谱鉴定。

1.3.2 临床分离株的菌种鉴定 取一清洁载玻片,滴加乳酸酚棉蓝染液 1 滴,然后用透明胶带粘取菌落贴于玻片上,加上盖玻片并稍压以除去气泡,在显微镜下观察孢子和分生孢子的形态、生长方式及菌丝特征,同时结合菌落生长速度、形态、质地和颜色等进行形态学鉴定。将红色毛癣菌接种于菌种保存液中,−80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,后续用于测序确认和验证 MALDI-TOF MS 数据库。

1.3.3 上机前标本的蛋白提取 将红色毛癣菌标准菌株和临床分离株分别用双甲酸夹心法和甲酸提取法作为蛋白提取方法,利用 MALDI-TOF MS 对菌株进行质谱数据采集。双甲酸夹心法:(1)吸取 1 μL 70%甲酸于靶板上,用牙签挑取菌落,在甲酸干燥前把丝状真菌均匀点涂到靶板上,待干;(2)吸取 1 μL 70%甲酸于靶板上,待干;(3)吸取 1 μL HCCA 基质液涂敷到标本上,待干燥后上机。

甲酸提取法: (1)牙签挑取适量菌丝转移到盛有 300 μ L 纯水的小型离心管中; (2)用移液枪反复吹打, 涡旋 1 min, 在小型离心管中形成均匀的混悬液; (3)添加 900 μ L 无水乙醇, 涡旋 1 min, 13 000 r/min 离心 2 min, 去上清液; (4)再次离心, 通过移液枪除去残余乙醇; (5)将 20 μ L 70% 的甲酸水溶液加入沉淀颗粒中, 移液枪反复吹打, 涡旋混匀; (6)加入 20 μ L 乙腈, 移液枪吹打混匀, 13 000 r/min 离心 2 min; (7)将 1 μ L 上清液移取到 MALDI-TOF MS 靶板上, 晾干; (8)将 1 μ L HCCA 基质液涂敷在标本上, 待干燥后上机。

1.3.4 数据采集 使用 FlexControl3.4 软件采集图谱, 采用正线性模式, 质量 2 000~20 000, 激光频率为 60 Hz, 加速电压 19.98 kV, 延迟提取电压 17.98 kV, 聚焦电压 5.99 kV, 延迟时间为 150 ns, 每个靶点设激光随机射击 6 个点, 每次射击 40 次, 用于建库的标准菌株制备 8 个靶位, 每个靶位采集 3 张指纹图谱; 用于验证数据库的验证菌每株制备 1 个靶位, 每个靶位采集 1 张指纹图谱。每次采集前均用 BTS 进行质量校正, 采用标准蛋白质试剂进行, 获得的谱峰与已知谱峰的 m/z 进行比对校准, 标准蛋白质试剂在大肠埃希菌 ATCC 25922 特征峰的基础上增加了核糖核酸酶 A ($13\,682\times 10^3$) 和肌红蛋白 ($16\,952\times 10^3$) 的谱峰。校正时, 需至少有 4 个与标准品产生的峰相符, 且峰强度至少为 200。

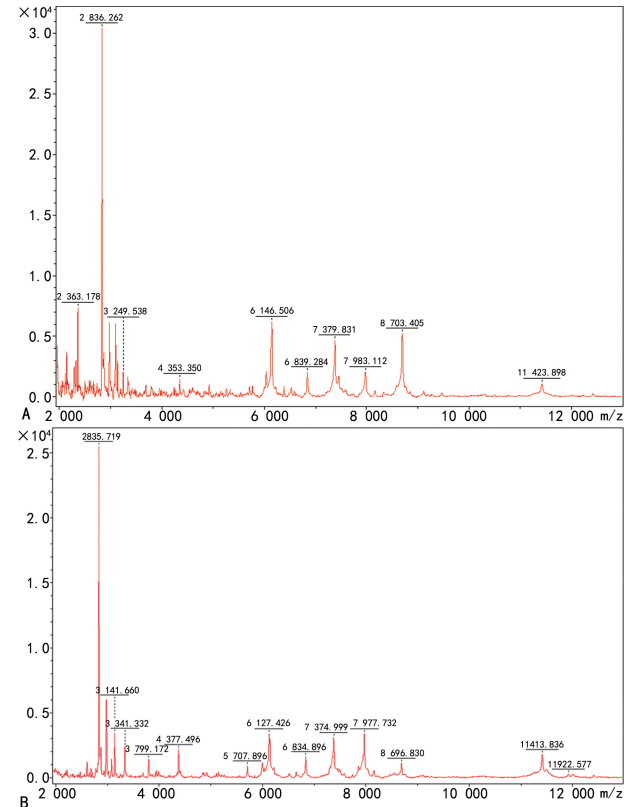
1.3.5 建立标准菌库 应用 Biotyper3.1 软件中的 MSP Creation 模块建立标准菌库。采用 Biotyper MSP Creation Standard Method 方法, 将标准菌株的 24 份质谱图创建为该菌种的预测波谱 (MSP), 构建红色毛癣菌标准菌鉴定数据库。以双甲酸夹心法作为标准菌株蛋白提取方法所构建的数据库命名为“双甲酸夹心法自建库”; 以甲酸提取法作为标准菌株蛋白提取方法所构建的数据库命名为“甲酸提取法自建库”。

1.3.6 MALDI-TOF MS 鉴定 应用 Biotyper3.1 软件中的 Identification 模块检测菌种, 采用 Biotyper MSP Identification Standard Method 方法, 分别选取本实验建立的 2 个标准菌库和商品库, 调入不同蛋白提取方法的待测菌株的质谱数据进行鉴定, 并记录鉴定得分, 以第 1 位鉴定结果为红色毛癣菌的得分作为该菌的鉴定得分, 无质谱峰或鉴定不准判为 0 分, 分析培养条件及蛋白提取方法对 MALDI-TOF MS 鉴

定效果的影响。
1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件处理数据, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间计量资料比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 红色毛癣菌标准菌库的建立 本研究构建了 2 种不同蛋白提取方法的红色毛癣菌标准菌株质谱数据库。通过软件统计生成相关波谱数据信息, 构建标准菌株数据库, 用于红色毛癣菌鉴定。见图 1。



注: A 表示双甲酸夹心法; B 表示甲酸提取法。
图 1 不同蛋白提取方法建立的红色毛癣菌标准菌株质谱图

2.2 MALDI-TOF MS 对 21 株临床分离株的鉴定结果 不论以双甲酸夹心法抑或甲酸提取法作为待测菌的蛋白提取方法, 甲酸提取法自建库与 Bruker 商品库合并使用的鉴定得分显著高于其余 2 个数据库, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 且与形态学鉴定的匹配度最高; 双甲酸夹心法自建库与 Bruker 商品库合并使用的鉴定得分与 Bruker 商品库单独使用的得分比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 MALDI-TOF MS 各数据库对 21 株红色毛癣菌的鉴定结果 ($\bar{x}\pm s$)

蛋白提取方法	数据库	得分(分)	匹配度	F	P
双甲酸夹心法	“双甲酸夹心法自建库+Bruker 商品库”	1.257 \pm 0.433 *	17/21	4.875	0.039
	“甲酸提取法自建库+Bruker 商品库”	1.484 \pm 0.281	19/21		
	“Bruker 商品库”	1.202 \pm 0.411 * #	17/21		

续表 1MALDI-TOF MS 各数据库对 21 株红色毛癣菌的鉴定结果($\bar{x} \pm s$)

蛋白提取方法	数据库	得分(分)	匹配度	F	P
甲酸提取法	“双甲酸夹心法自建库+Bruker 商品库”	1.388±0.417 [*]	19/21	7.202	0.003
	“甲酸提取法自建库+Bruker 商品库”	1.817±0.222	21/21		
	“Bruker 商品库”	1.331±0.345 ^{* #}	19/21		

注:与“甲酸提取法自建库+Bruker 商品库”比较,^{*} $P<0.05$;与“双甲酸夹心法自建库+Bruker 商品库”比较,[#] $P>0.05$ 。

3 讨 论

红色毛癣菌是一种非常重要的致病菌,寻求一种快速、准确的鉴定方法对该菌引起的皮肤癣菌病的诊断和治疗有着十分重要的意义。目前对该菌的鉴定除了传统的形态学鉴定手段外,还有各式各样的分子生物学方法,如特异引物 PCR、PCR-RFLP、随机引物 PCR、巢式 PCR 和质谱鉴定等^[7-11]。形态学鉴定主要依靠培养后镜下观察其形态特点和产孢情况,并结合菌落生长的形态和颜色等鉴定^[12],这需要检验人员有较高的专业知识水平和丰富的丝状真菌鉴定经验,且该方法耗时长,一般需要 10~15 d,对于一些形态不典型或不产孢的菌株往往鉴定不到种,对临床的早期诊断和治疗造成困难。分子生物学的方法弥补了传统形态学鉴定的不足,但其标本前处理步骤繁琐而未能临床实验室普及。MALDI-TOF MS 可以通过检测皮肤癣菌中固有的特异性蛋白形成的特征性图谱从而实现了对皮肤癣菌的快速鉴定^[13]。质谱在微生物鉴定中稳定性强、重复性好、操作简便、快速且结果准确,大大缩短了报告时间,已广泛应用于临床实验室^[14]。

与细菌不同,丝状真菌的细胞壁含有较多的几丁质成分,细胞壁厚且韧性和稳定性都较强,导致丝状真菌胞内核糖体蛋白释出困难,这是质谱鉴定真菌效果不如细菌的主要原因。甲酸提取法是 Bruker 系统推荐的丝状真菌质谱分析前处理方法,其中甲酸溶液起破坏细胞壁的作用,乙腈则有助于胞内核糖体蛋白的进一步释出。该方法要反复离心洗涤,操作繁琐费时,故临床实验室更偏好用直涂法。此外,质谱鉴定的准确性受许多因素影响,如培养基基质、培养条件、培养时间、菌株蛋白提取方法等。培养条件的改变会造成微生物表面蛋白、脂质、多肽等物质的改变^[15]。一些研究发现,真菌生长的早期与晚期对质谱质量峰的数量和强度存在显著的差异^[16-18]。李凤琴等^[19]研究发现,培养条件的改变,会导致微生物体内生物大分子发生变化,进而导致质谱标准菌库信息的不准确。要解决这一问题,就必须尽可能的丰富菌种数据库的信息,并且在鉴定待测菌时,应统一其培养条件。库充数据库的研究近几年逐渐增加,2017 年西班牙一个实验室用 390 株曲霉对自建库做了验证分析,95.5%达到了菌种水平^[20]。TRIEST 等^[21]在对自建库的研究中获得了 91%的菌种鉴定率。MALDI-TOF MS 用于丝状真菌鉴定的研究已有很多,但针对

红色毛癣菌研究的报道却不多见,尤其是标准菌库的建立更是空白。

RANQUE 等^[22]选取了 58 种共 625 株丝状真菌做质谱鉴定,鉴定正确率为 89%。LING 等^[23]对 33 篇 MALDI-TOF MS 鉴定丝状真菌的文献做了 meta 分析,表明了质谱鉴定丝状真菌虽然没有像鉴定细菌和酵母菌那样取得满意的效果,但相比其他方法鉴定率仍然较高。BECKER 等^[24]的研究表明质谱鉴定丝状真菌有 85.6%的正确鉴定率,而形态学只有 61.5%。但在临床实验室的应用中发现,质谱鉴定丝状真菌的准确性却达不到以上报道的水平。可能与以下因素有关:以上报道的实验均使用商业数据库建库时使用的旋转培养法对丝状真菌进行液体培养、甲酸提取法进行前处理,而在临床工作中,待测菌是通过固体培养法所得,前处理方法使用简便快速的双甲酸夹心直涂法,这可能是导致实际临床应用质谱鉴定丝状真菌效果不佳的原因之一。液体培养较少被用于临床微生物实验室,本实验以 SDA 固体培养基培养 5 d 所得的红色毛癣菌,分别用 2 种蛋白提取方法建立 MS 标准数据库,在操作流程上可以与常规皮肤癣菌鉴定工作进行更好地衔接,还可以不断丰富数据库内的图谱,逐渐提高自建库的鉴定能力。

本研究建立了一种相对简单、有效的标准菌库建立方法及红色毛癣菌的质谱鉴定方法。从表 1 可以看出,以甲酸提取法作为待测菌的蛋白提取方法、使用“甲酸提取法自建库+Bruker 商品库”的鉴定分值为(1.817±0.222)分,高于“双甲酸夹心法自建库+Bruker 商品库”和“Bruker 商品库”,相同培养基质及相同培养时间下培养的红色毛癣菌提供该菌特有的质谱信息,保证本实验建立的标准数据菌信息的准确性和原有数据库的完整性,待测菌株培养条件的统一避免了生物大分子的过度改变,确保鉴定结果准确。本实验室以 SDA 固体培养基培养 5 d 所得的红色毛癣菌标准菌株,以甲酸提取法作前处理建立的数据库,与原有商品库合并使用,对 21 株红色毛癣菌的鉴定得分明显高于原有商品库。即便如此,在以简易的双甲酸夹心法作为待测菌的蛋白提取方法,使用“双甲酸夹心法自建库+Bruker 商品库”并没有获得满意的鉴定效果,鉴定分值为(1.257±0.433)分。实验进一步证实,即使是建库时统一与待测菌的蛋白提取方法,也未能取得更好的鉴定效果,双甲酸夹心法操作简便,但用于红色毛癣菌鉴定的准确性欠佳,鉴定得

分低,充分提取菌体蛋白是提高质谱鉴定得分的关键因素。

4 结 论

本研究根据自身实验室特点建立红色毛癣菌 MS 标准数据库,丰富已有的商品数据库,应用于临床标本的检测,提高鉴定准确性,这将为其他皮肤癣菌 MALDI-TOF MS 标准数据库的建立提供更好的借鉴,MALDI-TOF MS 将会成为皮肤癣菌诊断领域不可或缺的工具。

参考文献

- [1] EYMANN C, WACHLIN G, ALBRECHT D, et al. Exo-proteome analysis of human pathogenic dermatophyte species and identification of immunoreactive proteins[J]. *Prote Clin Applic*, 2018, 12 (6): e1800007.
- [2] YAZDANPARAST A, JACKSON R C, BARTON R C, et al. Clinical and laboratory investigations molecular strain typing of *Trichophyton rubrum* indicates multiple strain involvement in onychomycosis[J]. *Br J Dermatol*, 2003, 148(1): 51-54.
- [3] 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.
- [4] 李修远, 黄艳飞, 尚军, 等. MALDI-TOF MS 在临床微生物鉴定中的常见问题及对策[J]. *临床检验杂志*, 2016, 34(12): 885-891.
- [5] NORMAND A C, 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] KUPSCH C, OHST T, PANKEWITZ F, et al. The agony of choice in dermatophyte diagnostics-performance of different molecular tests and culture in the detection of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22(735): 11-17.
- [9] HRYNCEWICZ-GWÓZDZ A, JAGIELSKI T, DOBROWOLSKA A, et al. Identification and differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates using PCR-RFLP and RAPD methods[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011, 30(6): 727-731.
- [10] 孔祥明, 杨国玲, 金礼吉, 等. 用任意引物聚合酶链反应进行皮肤癣菌的分子生物学研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2010, 34(5): 352-354.
- [11] 杨静, 童中胜, 万喆, 等. 巢式 PCR 诊断甲真菌病中红色毛癣菌和须癣毛癣菌[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2014, 30

- (3): 137-140.
- [12] 傅裕, 鲍迎秋, 常建民, 等. 红色毛癣菌的生物学特性和致病特点[J]. *中华全科医师杂志*, 2007, 6(8): 482-484.
- [13] 陈世敏. MALDI-TOF MS 在感染性疾病诊断中的应用[J]. *医学综述*, 2015, 21(22): 4127-4130.
- [14] GÖRKEM Y, ISIN A, SIMGE C. Evaluation of the MALDI-TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012, 73(1): 65-67.
- [15] 胡晓, 林肖惠, 佟巍, 等. 沙门菌 MALDI-TOF-MS 标准菌库的建立及应用研究[J]. *卫生研究*, 2014, 43(1): 40-46.
- [16] ALANIO A, BERETTI J L, DAUPHIN B, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinical relevant *Aspergillus* species[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17(5): 750-755.
- [17] DE C E, POSTERARO B, LASS-FLOERL C, et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18(5): 475-484.
- [18] SANTOS C, PATERSON R R, VENANCIO A, et al. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry[J]. *J Appl Microbiol*, 2010, 108(2): 375-385.
- [19] 李凤琴, 吴多加, 武淑真, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定食品真菌影响因素的探讨[J]. *中国食品卫生杂志*, 2007, 19(6): 481-488.
- [20] VIDAL-ACUNA M R, RUIZ-PEREZ D P M, TORRES-SANCHEZ M J, et al. Identification of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS)[J]. *Med Mycol*, 2017, 56(7): 838-846.
- [21] TRIEST D, STUBBE D, DE C K, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for identification of molds of the *Fusarium* genus[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(2): 465-476.
- [22] RANQUE S, NORMAND A C, CASSAGNE C, et al. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory[J]. *Mycoses*, 2014, 57(3): 135-140.
- [23] LING H Z, YUAN Z J, SHEN J L, et al. Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinical pathogenic fungi: a meta-analysis[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 52(7): 2573-2582.
- [24] BECKER P T, 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.