

• 论 著 •

MALDI-TOF MS 鉴定马尔尼菲篮状菌的实验条件优化*

刘俞谷^{1,2}, 贺莹^{1,2}, 傅俊方^{1,2}, 龙军^{1,2}, 熊君^{1,2}, 江凌晓^{1,2}, 王艳芳^{1,2△}

1. 南方医科大学珠江医院检验医学部微生物组医学中心, 广东广州 510282;

2. 南方医科大学珠江医院广东省公共卫生创新平台, 广东广州 510282

摘要:目的 构建用于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS)鉴定马尔尼菲篮状菌的数据库,并探索用于 MALDI-TOF MS 鉴定马尔尼菲篮状菌的最佳培养条件和前处理方法。方法 利用 8 株马尔尼菲篮状菌构建自建数据库,比较不同培养基[沙保弱葡萄糖琼脂培养基(SDA)、沙氏葡萄糖肉汤培养基(SDB)]、培养温度(28、35℃)、培养天数、前处理方法(甲酸乙腈法、直涂法)对质谱图质量及鉴定正确率的影响。结果 在 VITEK MS 科研模式(RUO 模式)中成功构建马尔尼菲篮状菌质谱自建数据库。SDA 较 SDB 更适合 MALDI-TOF MS 鉴定马尔尼菲篮状菌,后者采集的质谱谱图中干扰峰较多。两种温度培养采集的质谱谱图的特征峰相似,但 35℃ 菌落的鉴定正确率略高。培养 3~5 d 时的菌落鉴定正确率均高于 71.4%,其中培养 5 d 时鉴定正确率最高,可达 100.0%。甲酸乙腈法的提取效果优于直涂法。结论 马尔尼菲篮状菌在 SDA 上 35℃ 培养 3~5 d,并使用甲酸乙腈法进行前处理可得到最佳的鉴定正确率。这对于形态不典型的马尔尼菲篮状菌同样适用。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术; 马尔尼菲篮状菌; 鉴定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.02.001

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2022)02-0129-06

文献标志码:A

Study on the optimized pretreatment conditions for identification of *Talaromyces marneffei* by MALDI-TOF MS*

LIU Yugu^{1,2}, HE Ying^{1,2}, FU Junfang^{1,2}, LONG Jun^{1,2},
XIONG Jun^{1,2}, JIANG Lingxiao^{1,2}, WANG Yanfang^{1,2△}

1. Microbiome Medicine Center, Department of Laboratory Medicine, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China; 2. Innovation Platform for Public Health of Guangdong Province, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China

Abstract: **Objective** To construct the database of *Talaromyces marneffei* for Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification, and to explore the best culture conditions and pretreatment method for MALDI-TOF MS identification of *Talaromyces marneffei*. **Methods** A self-built mass spectrometry database was constructed by using 8 strains of *Talaromyces marneffei*. The effects of different culture media [Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Broth (SDB)], culture temperature (28, 35℃), culture day and pretreatment methods (formic acid acetonitrile method and direct coating method) on the quality of spectrum and the accuracy of identification were compared. **Results** In VITEK MS research use only mode (RUO mode), the self-built mass spectrometry database of *Talaromyces marneffei* was successfully constructed. SDA was more suitable for MALDI-TOF MS identification of *Talaromyces marneffei* than SDB, and the latter had more interference peaks in the acquisition spectrum. The characteristic peaks of the spectra collected at the two temperatures were similar, but the identification accuracy of colonies at 35℃ was slightly higher. The accuracy rate of colony identification was higher than 71.4% when cultured for 3—5 days, and the highest rate could reach 100.0% when cultured for 5 days. The extraction effect of formic acid acetonitrile method was better than that of direct coating method.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81873974);广东省自然科学基金项目(2016A030313629)。

作者简介:刘俞谷,女,硕士研究生在读,主要从事深部真菌感染的实验室诊断研究。△ 通信作者, E-mail:gzwyf2010@163.com。

本文引用格式:刘俞谷,贺莹,傅俊方,等. MALDI-TOF MS 鉴定马尔尼菲篮状菌的实验条件优化[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(2):

Conclusion The best identification accuracy could be obtained by culturing *Talaromyces marneffei* on SDA at 35 °C for 3—5 days and pretreated with formic acid acetonitrile method. This is also applicable to the *Talaromyces marneffei* with atypical morphology.

Key words: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry; *Talaromyces marneffei*; identification

马尔尼菲篮状菌(TM)是一种双相真菌,流行于东南亚地区及我国南方地区,可致播散性感染,多发于免疫缺陷患者,其病情凶险、预后差,因此早期准确鉴定尤为重要^[1-3]。目前, TM 的鉴定以其典型菌落特征(温度双相性和红色素)为主,但对于形态不典型菌株,单一温度培养时检验人员易出现判断错误的情况,从而延误患者的诊治。分子生物学方法虽是“金标准”,但目前尚不适用于临床检验科的常规鉴定。近年来,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS)在微生物鉴定领域发展迅速,因其具有快速准确的优点被称为最有前景的鉴定方法^[4-5]。目前 MALDI-TOF MS 应用较广泛的有 Bruker Biotyper 及 VITEK MS 系统,但其对于双相真菌的应用研究较为滞后^[6]。本研究拟在 VITEK MS 科研模式(RUO 模式)中构建 TM 的参考数据库,并通过比较不同培养条件及样品前处理方法,探索用于 TM 质谱鉴定的最佳培养条件和前处理方法。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 南方医科大学珠江医院检验科分离的 TM 8 株,菌株编号分别为 ZJ01、ZJ02、ZJ2360、ZJ399、ZJ18919110、ZJ110307、ZD180201、ZJLin,以上菌株均经形态学及 ITS 测序鉴定。以大肠埃希菌 ATCC 8739 作为校准和内质控菌株。

1.2 仪器与试剂 MALDI-TOF MS 仪(法国生物梅里埃股份有限公司,数据库版本 V3.0, RUO 模式);隔水式电热恒温箱(28, 35 °C),高速冰冻离心机,大型落地摇床(美国 Thermo Fisher 科技有限公司);电子天平;沙保弱葡萄糖琼脂培养基(SDA, 广州市迪景微生物科技公司);VITEK MS-CHCA 基质液(主要成分为 α -氰基-4-羟基肉桂酸)、VITEK MS-FA(主要成分为甲酸,酵母菌前处理液)、VITEK MS-DS 靶板(法国生物梅里埃股份有限公司);葡萄糖,蛋白胨[生工生物工程(上海)股份有限公司];70%乙醇,甲酸,乙腈(天津市化学试剂供销公司),蒸馏水等。

1.3 方法

1.3.1 分生孢子悬液制备 于 SDA 平板接种上述 8 株 TM, 28 °C 培养 5 d, 用含 0.05% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液收集菌液,并经 12 层无菌纱布过滤得到孢子悬液,计数并调节孢子浓度为 2×10^7 个/毫升。

1.3.2 菌株培养 取上述 TM 菌株约 2×10^6 个孢子接种于 SDA、沙氏葡萄糖肉汤培养基(SDB)中,于 28、35 °C 进行培养,分别在第 3、5、7、9 天取菌落前处

理进行质谱鉴定。以编号 ZD180201 菌株的质谱数据建立 TM 质谱参考库。其余 7 株 TM 用于验证参考库及构建 TM 超级谱图库。

1.3.3 菌落前处理方法 酵母相菌落(35 °C)分别采用甲酸乙腈法或者直涂法处理,菌丝相菌落(28 °C)生长过程的孢子与菌丝不够丰富,且部分生长呈现“咬琼脂”现象,难取样,因此未采用直涂法,按照 VITEK MS 推荐的丝状真菌前处理方法即甲酸乙腈法处理,具体步骤如下。甲酸乙腈法:按照 VITEK MS 丝状真菌前处理方法进行处理,即生物安全柜内挑 SDA 或 SDB 中菌落分别于 900 μ L 70%乙醇静置 10 min, 14 000 r/min 离心 2 min,弃上清液;沉淀中加入 70%甲酸和乙腈各 40 μ L 振荡混匀, 14 000 r/min 离心 2 min。取 1 μ L 上清液及质控菌株加于靶板点位上,干燥后覆盖 1 μ L CHCA 基质液,室温下干燥上机,自动采集质谱谱图。直涂法:生物安全柜内直接取酵母相菌落适量涂靶板,待干后加入 0.5 μ L VITEK MS-FA,干燥后覆盖 1 μ L CHCA 基质液,同上采集质谱谱图。

1.3.4 构建参考库 以其中 1 株(编号 ZD180201)在不同培养基(SDA、SDB),培养温度(28、35 °C),培养天数(3、5、7、9 d),前处理方法(甲酸乙腈法、直涂法)的高质量谱图,即背景噪音低、基峰分辨率高、主次峰分布错落有致、一致性好、主峰信号强度高、基线稳定及出峰数为 80~250 个的谱图,构建 TM 参考库,加入 VITEK SARAMI 数据库中。

1.3.5 结果判读 专用分析软件对鉴定结果进行判读,版本为 V3.0。靶板点位通过点位颜色变化来提示结果的可信度,通常有绿、黄、红 3 种颜色。绿色提示只有一个鉴定结果,概率为 60.0%~99.9%,结果可信度水平高。黄色提示仪器对标本分辨率较低,需要进一步采用试验进行区别。红色提示与数据库中任何质谱不匹配。

1.3.6 验证并创建超级谱图库 利用其余 7 株 TM 验证 TM 参考库,并汇总高质量质谱谱图,创建超级谱图库,保留 39~41 个特征性峰,特征性峰权重之和 ≤ 1400 。

1.4 统计学处理 计数资料以频数或百分率表示,比较不同培养天数、培养温度、前处理方法时的 TM 质谱鉴定正确率。正确率 = 正确鉴定菌株数/总数 $\times 100\%$ 。因样本量小,未进行统计分析。

2 结果

2.1 不同培养天数、培养温度及前处理条件对 TM

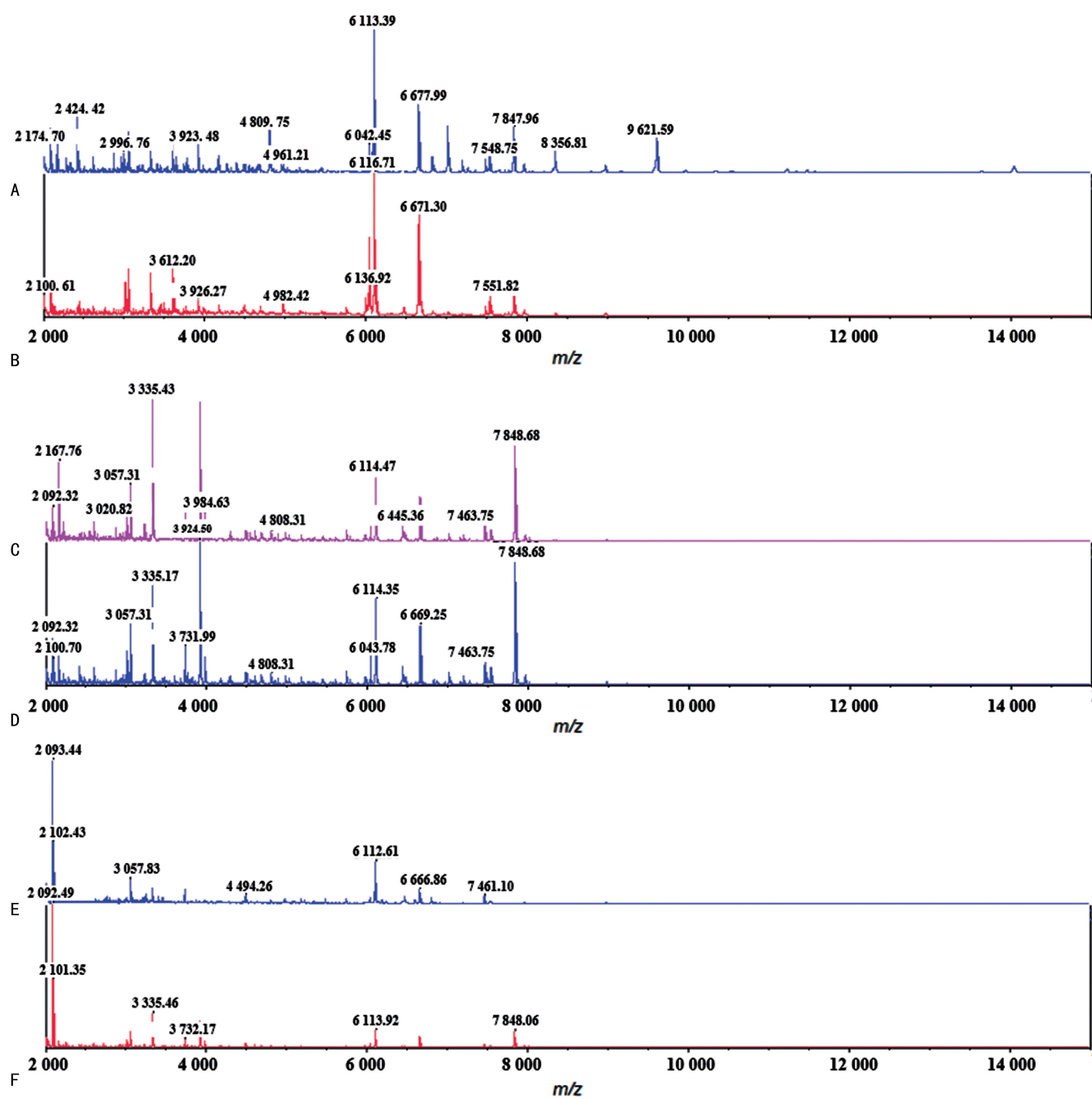
质谱谱图的影响 TM 质谱谱图的离子峰以位于质荷比 m/z 7 848.00、6 113.00、6 668.00、3 335.00 附近的特征峰为主,见图 1。不同培养温度时,特征峰信号基本相似但略有不同,28 ℃ 培养特征峰主要以 m/z 6 113.00 附近为主峰,见图 1A、B,而 35 ℃ 培养以 m/z 7 848.00 附近为主峰,见图 1C、D。

相比于 SDB,SDA 培养的 TM 更易采集到较多的特征离子峰信号且强度明显的高质量质谱谱图,见图 1A、B。TM 在 SDB 35 ℃ 培养的菌落采集的高质量谱图数量较少,谱图主要表现为干扰峰多,特征峰信号强度不明显,未纳入参考库。且未使用 SDB 继续

对其他 7 株临床分离菌株进行培养。

不同培养时长对特征峰的数量与强度影响较为明显,培养 3~5 d 时采集的质谱谱图质量更佳,可获得较多数量且信号强度明显的特征峰,信噪比较高,见图 1A、B、C、D,而培养第 9 天时特征峰的数量明显减少且信号强度减弱,甚至消失,见图 1E、F。

甲酸乙腈法与直涂法前处理方法进行比较后发现,在特征峰最佳的第 3 天培养时,甲酸乙腈法较直涂法可获得更多数量、信号强度更明显的特征峰,且信噪比更高,质谱谱图与参考库中的特征性质谱图匹配效果更好,提示蛋白提取效果更佳,见图 1C、D。



注:A为28 ℃,SDA培养3 d,甲酸乙腈法;B为28 ℃,SDB培养3 d,甲酸乙腈法;C为35 ℃,SDA培养5 d,直涂法;D为35 ℃,SDA培养5 d,甲酸乙腈法;E为28 ℃,SDA培养9 d,甲酸乙腈法;F为35 ℃,SDA培养9 d,直涂法。

图1 VITEK MS RUO 模式中建立的 TM 质谱谱图

2.2 MALDI-TOF MS 对不同培养温度、培养天数的 TM 的鉴定正确率比较 不同培养温度下的 TM 鉴定结果显示,在相同培养天数时,35 ℃ 培养菌落鉴定正确率均高于 28 ℃ 培养菌落,其中 35 ℃ 培养 3~7 d 内鉴定正确率均超过 70.0%,培养 5 d 时鉴定正确率可达 100.0%。而 28 ℃ 培养菌落则需要在培养 3~5 d 内行 MALDI-TOF MS 鉴定,正确率可超过 70.0%,见表 1。

不同培养天数下的 TM 鉴定结果显示,培养第 5 天鉴定正确率最高(28 ℃ 培养时鉴定正确率为 85.7%,35 ℃ 培养时鉴定正确率为 100.0%),而培养第 9 天时鉴定正确率最低,均不足 50.0%,见表 1。

表 1 VITEK MS RUO 模式对不同培养温度、培养天数的 TM 鉴定正确率比较[n/n(%)]

培养天数(d)	培养温度	
	菌丝相(28 ℃)	酵母相(35 ℃)
3	5/7(71.4)	6/7(85.7)
5	6/7(85.7)	7/7(100.0)
7	3/7(42.9)	5/7(71.4)
9	2/7(28.6)	3/7(42.9)

注:本组菌株前处理方法均为甲酸乙腈法。

2.3 MALDI-TOF MS 对不同前处理方法培养的 TM 的鉴定正确率比较 利用甲酸乙腈法、直涂法对 35 ℃,SDA 培养的 TM 进行前处理,结果显示,经甲酸乙腈法提取蛋白进行鉴定的正确率略高于直涂法,见表 2。另外,甲酸乙腈法及直涂法对 TM 的鉴定效果均表现为培养第 3~5 天鉴定正确率最高,随着培养时间延长,鉴定正确率降低,见表 2。

表 2 VITEK MS RUO 对不同前处理方法的 TM 的鉴定正确率比较[n/n(%)]

培养天数(d)	前处理方法	
	甲酸乙腈法	直涂法
3	6/6(100.0)*	5/7(71.4)
5	7/7(100.0)	6/7(85.7)
7	5/7(71.4)	5/7(71.4)
9	3/7(42.9)	4/7(57.1)

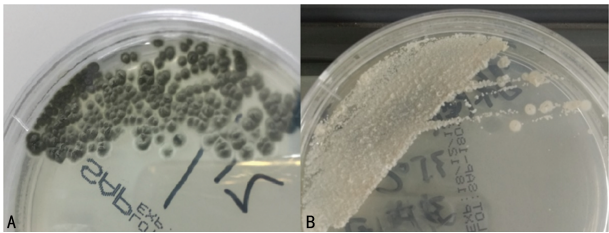
注:*为 1 株不典型菌株(编号 ZJLin)在 35 ℃ 培养 3 d 时,菌落生长缓慢,难以刮取足够菌体进行鉴定,因此未进行鉴定。

2.4 MALDI-TOF MS 在不典型 TM 鉴定中的价值

2.4.1 不典型 TM 的形态学特征 本研究中的不典型 TM 菌株分离自南方医科大学珠江医院患者肺泡灌洗液和痰液,形态学表现为温度双相型,但是红色素产生极缓慢,28 ℃ 培养 7~9 d 局部开始分泌红色素,经 ITS 测序证实为 TM(100%),见图 2。

2.4.2 TM 自建数据库在不典型菌株鉴定中的应用 对于 28 ℃ 培养 7 d 未分泌红色素的不典型 TM 菌株(编号 ZJLin),生长速度较典型 TM 慢,但培养 3~5 d 时可被 TM 自建数据库正确鉴定,而培养第 7~9 天均无法经 TM 自建数据库正确鉴定。不同温

度和前处理方法对鉴定结果均无差异。见表 3。



注:A 为 28 ℃,B 为 35 ℃。

图 2 不典型 TM(编号 ZJLin)在 SDA 上不同温度培养 6 d 菌落形态

表 3 VITEK MS RUO 模式 TM 自建数据库在不典型 TM 鉴定中的应用

培养天数(d)	培养温度(℃)	前处理方法	
		甲酸乙腈法	直涂法
3	28	是	未测
5		是	未测
7		否	未测
9		否	未测
3	35	未测*	是
5		是	是
7		否	否
9		否	否

注:*为 35 ℃ 培养 3 d 时,菌落很小,难以刮取足够菌体,因此未进行鉴定。

3 讨 论

近年来,随着免疫抑制人群数量的增加,TM 感染发病率也随之上升。目前临床微生物实验室对 TM 的鉴定,主要依赖其温度双相的菌落特征(35 ℃ 培养为酵母样,28 ℃ 培养为霉菌样)及典型红色素来判断,但形态学鉴定主要依赖于检验人员的经验。分子生物学鉴定则需要获取足够数量的菌体。对于生长缓慢的菌落,其鉴定耗时长。这限制了 TM 感染的早期诊断和及时治疗。同时,形态不典型菌株的出现,向微生物实验室对 TM 的快速准确鉴定提出挑战。

MALDI-TOF MS 是微生物鉴定领域的一项极具前景的新技术,有成本低、耗时短、准确、高效等优点,可实现菌株的快速鉴定,目前在国内检验科被广泛推广。但国内外常用的 Bruke Biotyper 及 VITEK MS 系统均无 TM 鉴定参考库,且适合用于 TM 质谱鉴定的菌落培养条件及前处理方案鲜有报道。

质谱鉴定的准确性受许多因素影响,如培养基种类、培养条件、培养时间、蛋白提取方法等^[7]。本研究比较了两种温度(28、35 ℃)、两种培养基(SDA、SDB)培养 3~9 d 的质谱鉴定正确率。其中从 SDB 35 ℃ 培养菌落采集的质谱谱图数量少,干扰峰较多且特征峰信号强度不明显,考虑为液体培养基摇菌时菌量不足及洗涤不充分所致。因此,操作时应尽可能将菌落沉淀洗涤干净。另外,从 28 ℃ SDA 及 SDB 中培养

菌落采集到的质谱谱图无明显差异。液体培养基培养操作较复杂,培养液等营养成分会干扰质谱分析,且菌落培养耗时更长,因此固体培养基更适合临床微生物室的快速鉴定。LAU 等^[8]发现,补充构建数据库后,MALDI-TOF MS 能准确鉴定 TM,其菌丝相和酵母相质谱谱图类似。本研究发现 TM 菌丝相及酵母相的特征峰相似,且与文献报道的主峰一致,但在 35 ℃ 培养时鉴定正确率略高。

不同真菌培养时间下质谱谱图的特征峰数量和强度存在明显差异^[9-11]。本研究发现,TM 培养 3~5 d 时进行质谱鉴定的正确率高,且第 5 天最佳,可达 100.0%。这主要与此时质谱谱图质量佳、信噪比高及鉴定结果稳定有关。随着培养时间的延长,特征峰信号强度减弱,甚至消失,从而出现错误鉴定或无鉴定结果,这可能与真菌细胞壁较厚且坚韧难破壁、色素产生干扰等有关。

TM 于 28 ℃ 时呈菌丝相,35 ℃ 呈酵母相生长。法国梅里埃公司推荐对丝状真菌采取甲酸乙腈法,对酵母菌采用直涂法进行前处理。直涂法用于酵母菌鉴定效果好,且适用于多种商业化 MALDI-TOF MS 系统^[12-15]。而甲酸乙腈法是利用甲酸及乙腈对菌体进行蛋白提取来获得高质量质谱谱图,不仅适用于酵母菌鉴定^[16],也适用于曲霉、皮肤癣菌等丝状真菌鉴定^[17-20]。本研究比较两种前处理方法对 TM 酵母相菌落的鉴定发现,对培养 3~5 d 的菌落,甲酸乙腈法的鉴定正确率略优于直涂法(100.0%、100.0% *vs.* 71.4%、85.7%)。这与甲酸乙腈法蛋白提取更充分有关。

综上所述,本研究发现经 SDA 培养 3~5 d 的酵母相(35 ℃)菌落,经甲酸乙腈法处理后,可获得良好的质谱谱图,鉴定正确率高。此条件也同样适用于形态不典型的 TM,为 TM 的快速、准确鉴定提供了辅助手段。但本研究仅纳入 8 株 TM 的质谱谱图,还需要更多菌株进一步完善数据库并验证。MALDI-TOF MS 提高了真菌鉴定的准确性,但在鉴定中仍需努力解决如生物安全问题、少见菌株数据库问题及样本处理标准化等问题。

参考文献

- [1] CHAN J F, LAU S K, YUEN K Y, et al. Talaromyces (Penicillium) marneffeii infection in non-HIV-infected patients[J]. Emerg Microbes Infect, 2016, 5(3): e19.
- [2] CAO C, XI L, CHATURVEDI V. Talaromyces (Penicillium) marneffeii: insights into the clinical trends of a major fungal disease 60 years after the discovery of the pathogen[J]. Mycopathologia, 2019, 184(6): 709-720.
- [3] LAU S, TSANG C C, WOO P. Talaromyces marneffeii genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomic studies reveal mechanisms for environmental adaptations

- and virulence[J]. Toxins(Basel), 2017, 9(6): 192-197.
- [4] SINGHAL N, KUMAR M, KANAUIA P K, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis[J]. Front Microbiol, 2015, 6(2): 791-804.
- [5] KASSIM A, PFLÜGER V, PREMJI Z, et al. Comparison of biomarker based Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast[J]. BMC Microbiol, 2017, 17(1): 128-144.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] LAU S K, LAM C S, NGAN A H, et al. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for rapid identification of mold and yeast cultures of Penicillium marneffeii[J]. BMC Microbiol, 2016, 16: 36-45.
- [9] 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 clinically relevant Aspergillus species[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(5): 750-755.
- [10] DE CAROLIS E, POSTERARO B, LASS-FLÖRL 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.
- [11] SANTOS C, PATERSON R R, VENÂNCIO 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.
- [12] BILLE E, DAUPHIN B, LETO J, et al. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, Aspergillus spp. and positive blood cultures[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(11): 1117-1125.
- [13] WON E J, SHIN J H, LEE K, et al. Accuracy of species-level identification of yeast isolates from blood cultures from 10 university hospitals in South Korea by use of the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Vitek MS system[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(9): 3063-3065.
- [14] PENCE M A, MCELVANIA T E, WALLACE M A, et al. Comparison and optimization of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(10): 1703-1712.
- [15] IRIART X, LAVERGNE R A, FILLAUX J, et al. Routine identification of medical fungi by the(下转第 142 页)

ti-endothelial cell antibodies in patients with rheumatoid vasculitis[J]. *Arthritis Rheum*, 1989, 32(9):1191-1192.

[39] ROSENBAUM J, POTTINGER B E, WOO P, et al. Measurement and characterisation of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases[J]. *Clin Exp Immunol*, 1988, 72(3):450-456.

[40] RONDA N, HAURY M, NOBREGA A, et al. Analysis of natural and disease-associated autoantibody repertoires: anti-endothelial cell IgG autoantibody activity in the serum of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Int Immunol*, 1994, 6(11):1651-1660.

[41] VAN DER ZEE J M, MILTENBURG A M, SIEGERT C E, et al. Antiendothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus: enhanced antibody binding to interleukin-1-stimulated endothelium[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1994, 104(2):131-136.

[42] WANG M X, WALKER R G, KINCAID-SMITH P. Clinicopathologic associations of anti-endothelial cell antibodies in immunoglobulin A nephropathy and lupus nephritis [J]. *Am J Kidney Dis*, 1993, 22(3):378-386.

[43] LI J S, LIU M F, LEI H Y. Characterization of anti-endothelial cell antibodies in the patients with systemic lupus erythematosus: a potential marker for disease activity[J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1996, 79(3):211-216.

[44] HILL M B, PHIPPS J L, MILFORD-WARD A, et al. Further characterization of anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus by controlled immunoblotting[J]. *Br J Rheumatol*, 1996, 35(12):1231-1238.

[45] MATSUDA J, GOTOH M, GOHCHI K, et al. Anti-endothelial cell antibodies to the endothelial hybridoma cell line (EAhy926) in systemic lupus erythematosus patients with antiphospholipid antibodies [J]. *Br J Haematol*, 1997, 97(1):227-232.

[46] NAVARRO M, CERVERA R, FONT J, et al. Anti-endothelial cell antibodies in systemic autoimmune diseases: prevalence and clinical significance [J]. *Lupus*, 1997, 6(6):521-526.

[47] HILL M B, PHIPPS J L, HUGHES P, et al. Anti-endothelial cell antibodies in primary antiphospholipid syndrome and SLE: patterns of reactivity with membrane antigens on microvascular and umbilical venous cell membranes[J]. *Br J Haematol*, 1998, 103(2):416-421.

[48] REVELEN R, BORDRON A, DUEYMES M, et al. False positivity in a cyto-ELISA for anti-endothelial cell antibodies caused by heterophile antibodies to bovine serum proteins[J]. *Clin Chem*, 2000, 46(2):273-278.

[49] LEGENDRE P, REGENT A, THIEBAULT M, et al. Anti-endothelial cell antibodies in vasculitis: a systematic review[J]. *Autoimmun Rev*, 2017, 16(2):146-153.

[50] KONDO A, TAKAHASHI K, MIZUNO T, et al. The Level of IgA antibodies to endothelial cells correlates with histological evidence of disease activity in patients with lupus nephritis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e163085.

(收稿日期:2021-01-02 修回日期:2021-09-30)

(上接第 133 页)

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.

[16] NORMAND A, GABRIEL F, RIAT A, et al. Optimization of MALDI-TOF Mass Spectrometry for yeast identification: a multicenter study [J]. *Med Mycol*, 2020, 58(5):639-649.

[17] SUH S O, GROSSO K M, CARRION M E. Multilocus phylogeny of the Trichophyton mentagrophytes species complex and the application of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for the rapid identification of dermatophytes[J]. *Mycologia*, 2018, 110(1):118-130.

[18] AMÉRICO F M, SIQUEIRA L P, NEGRO G M, et al. Evaluating VITEK MS for the identification of clinically relevant *Aspergillus* species[J]. *Med Mycol*, 2020, 58(3):322-327.

[19] RYCHERT J, SLECHTA E S, BARKER A P, et al. Multicenter evaluation of the Vitek MS v3.0 system for the identification of filamentous fungi[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(2):e01353-e01417.

[20] 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*, 2020, 41(4):418-422.

(收稿日期:2021-04-13 修回日期:2021-08-21)