

· 短篇论著 ·

3 种方法对曲霉菌鉴定结果对比研究*

张春华¹, 胡明冬¹, 蒋敏², 吴倩^{3△}

1. 陆军军医大学第二附属医院健康管理科, 重庆 400037; 2. 重庆新桥社区卫生服务中心, 重庆 400037;
3. 重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010

摘要:目的 对传统手工法、分子测序、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)3种鉴定方法进行比较,建立一套适合该实验室的快速准确的丝状真菌鉴定标准操作流程。方法 收集2020年1月至2021年3月于重庆医科大学附属第二医院住院患者的56株曲霉菌株,分别采用上述3种鉴定方法对菌株进行鉴定,比较鉴定准确率;比较传统甲酸乙腈萃取法与改良锆珠甲酸乙腈法两种前处理方法对质谱鉴定能力的影响;比较曲霉菌不同培养基及培养天数对质谱鉴定能力的影响。结果 以分子测序为金标准,传统手工法鉴定准确率为57.1%(32/56),MALDI-TOF MS鉴定准确率为92.9%(52/56);菌丝在锆珠中震荡研磨后,再进行甲酸乙腈萃取获得的质谱鉴定能力更佳;曲霉菌用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养3d和5d时,质谱鉴定准确率最高,分别为73.2%和75.0%。结论 MALDI-TOF MS操作简便、快速,且准确性高。曲霉菌用PDA液体水平振荡培养后,使用锆珠甲酸乙腈法前处理,进行质谱鉴定可获得较理想的鉴定效果和蛋白图谱质量,适合常规实验室曲霉菌的质谱鉴定。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 丝状真菌; 快速鉴定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.23.024

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2023)23-2938-04

文献标志码:A

侵袭性肺曲霉病(IPA)是指由曲霉菌所致的肺部感染疾病。随着器官移植广泛开展,免疫抑制剂和广谱抗菌药物的大量使用,使得IPA感染率呈逐年上升趋势^[1]。IPA临床症状不典型,与病毒性肺炎难以鉴别。对IPA的诊断,主要根据临床表现、体征、影像学、实验室检测组织病理中发现45°角分枝的菌丝或曲霉头为金标准^[2]。而在实际工作中,对曲霉菌的鉴定形态学传统手工法准确率低且耗时长,特别是少见曲霉菌,需依赖经验丰富的检验科工作人员。而基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)鉴定时间短,准确率高,结合血清学方法,能极大提高曲霉病诊断的准确率。本研究对2020年1月至2021年3月重庆医科大学附属第二医院检出的56株曲霉菌株,采用传统手工法、分子测序、MALDI-TOF MS 3种鉴定方法进行比较。由医学真菌中心(南京皮肤病研究所)对菌株进行分子测序,评价本实验室传统手工法对曲霉菌的鉴定状况。针对MALDI-TOF MS方法,探讨适合于曲霉菌质谱鉴定的最佳前处理方式,实现曲霉菌质谱的快速鉴定,并建立一套适合实验室丝状真菌鉴定标准操作流程。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集2020年1月至2021年3月重庆医科大学附属第二医院住院患者确诊或临床诊断为慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘、中耳炎、肿瘤患者

的菌株,同一患者多次分离出同一丝状真菌以1株计算,共分离培养出曲霉菌56株,收集并保存菌种。其中肺泡灌洗液标本分离出12株,痰液标本分离出35株,纤支镜刷取物标本分离出3株,耳分泌物标本分离出4株,鼻窦分泌物标本分离出2株。

1.2 仪器与试剂 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA, OXID有限公司,培养基为粉剂,需配制成固体培养基), O-MEGA FUNGAL DNA KIT1000(广州飞扬生化科技有限公司代理), PCR扩增仪(美国BIO-RED S1000), DL2000 DNA Marker, 2×TSINGKE Master Mix、通用引物β-tubulin(北京擎科新业生物技术有限公司), Bruker BioTyper系统(德国Bruker公司), 甲酸和乙腈溶液(上海凌峰化学试剂有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 传统手工法 按照《全国临床检验操作规程》真菌培养鉴定程序进行^[3]。

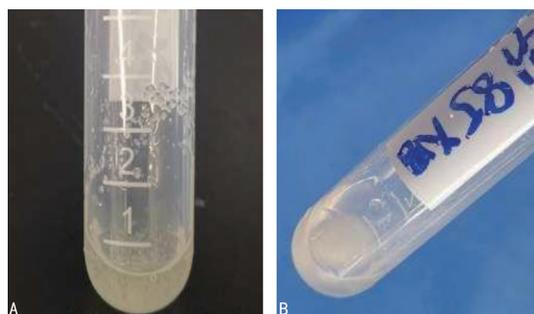
1.3.2 分子测序 提取模板DNA:按OMEGA FUNGAL DNA KIT1000试剂盒标准规程操作。目的基因扩增:按照以上步骤提取的DNA模板进行PCR扩增真菌ITS区域,本研究通用引物β-tubulinF: AATTGGTGGTGAAGATTTCTGG; R: AGT-TGTCGGACGGAATAG^[4]。PCR反应总体积50 μL: DNA模板4 μL, 引物各1 μL, 2×TSINGKE Master Mix 12.5 μL, 蒸馏水6.5 μL。PCR反应在

* 基金项目: 国家科技部重点研发计划(2020YFC2008900, 2020YFC2008903)。

△ 通信作者, E-mail: 1109892827@qq.com。

PCR 扩增仪中进行,设置 PCR 反应程序:95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 90 s,共 35 个循环,72 °C 保持延伸 7 min。PCR 扩增产物送安徽通用生物系统有限公司进行测序。将每一株丝状真菌的测序结果在 Pubmed 网站上通过 BLAST 检索,与数据库中条目进行比对,选择同源性最大的结果作为分子测序鉴定的结果。

1.3.3 MALDI-TOF MS 鉴定 (1)甲酸乙腈萃取法^[5-6]:用接种环刮取 PDA 培养 3 d 的菌落,挑取边缘菌丝,加入 300 μL 纯水+900 μL 无水乙醇,以 13 000 r/min 震荡离心 2 min,弃去上清液,干燥。加入 70% 甲酸 50 μL,4 000 r/min 破壁震荡 20 s,重复两次,放置 5 min。加入乙腈 50 μL,放置 5 min。以 13 000 r/min 离心 2 min,取上清液为真菌蛋白模板。(2)锆珠碾磨甲酸乙腈萃取改良法:用接种环刮取 PDA 培养 2 d 的幼龄菌丝,挑入 1 mL 土豆肉汤中于摇床水平摇动 28°增菌 24 h,形成肉眼细密菌落,加入两粒锆珠,余下操作同甲酸乙腈萃取法。见图 1。(3)取 1 μL 真菌蛋白点靶,自然干燥后覆盖基质 1 μL,自然干燥后进行质谱鉴定。(4)鉴定评分:每株菌点靶两次进行鉴定,结果一致时的菌名和鉴定得分,将鉴定标准定为:鉴定到种得分≥2.0 分;低于 2.0 分但所有鉴定结果前 5 位为同一种菌,得分在 1.7~2.0 分为鉴定到属,低于 1.7 分或鉴定结果为多种菌为无鉴定结果。



注:A 为水平振摇形成的细密菌落图;B 为垂直振摇的细密菌落图;水平振摇获得菌丝更为均匀和细致。

图 1 烟曲霉菌在空气摇床水平震荡和垂直震荡及在土豆肉汤培养 24 h 的结果

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 和 WHONET5.6 软件对收集到的数据进行统计汇总分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 56 株曲霉菌采用 3 种方法进行鉴定的结果比较 以分子鉴定结果为金标准,质谱鉴定种属 52 株,准确率为 92.9%(52/56),手工鉴定 32 株,准确率为 57.1%(32/56)。质谱鉴定的准确率明显高于手工鉴定($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 两种丝状真菌蛋白提取法质谱结果比较 56 株曲霉菌采谱方式有两种:一种为 PDA 固体培养 72 h 取菌丝,按照锆珠碾磨甲酸乙腈萃取改良法提取蛋白

液采谱,质谱鉴定到曲霉菌种属准确率为 73.2%(41/56);第二种为用 PDA 液体水平振摇 24 h 取菌丝采谱,再以锆珠碾磨甲酸乙腈萃取获得菌丝蛋白液,质谱鉴定到曲霉菌种属准确率为 92.9%(52/56)。两种采谱方法比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。曲霉菌采用 PDA 液体水平振摇培养 24 h 取得的质谱图更优。见表 2。

表 1 56 株曲霉菌采用 3 种方法进行鉴定的结果比较(n)

分子鉴定	n	质谱鉴定			手工鉴定
		种	属	无鉴定	
烟曲霉菌	32	22	7	2	21
黄曲霉菌	10	6	4	0	4
黑曲霉菌	14	8	5	1	7
合计		36	16	3	32

表 2 两种丝状真菌蛋白提取法质谱结果比较(n)

菌种名称	n	PDA 固体培养 72 h			PDA 液体水平振摇 24 h		
		种	属	无鉴定	种	属	无鉴定
烟曲霉菌	32	12	13	7	22	7	3
黄曲霉菌	10	3	3	4	6	4	0
黑曲霉菌	14	6	4	4	8	5	1
合计		21	20	15	36	16	4

2.3 PDA 培养天数对质谱鉴定曲霉菌能力的影响

本研究选用 PDA 对 56 株曲霉菌株进行培养,并分别在 2、3、5、7、9 d 提取真菌蛋白,运用 BRUKER MALDI-TOF MS 进行采谱,PDA 培养 2 d 质谱鉴定到种的准确率为 25.0%,3 d 为 37.5%,5 d 为 33.9%,7 d 为 8.9%,9 d 为 1.7%。培养 3、5 d 质谱鉴定准确率分别为 73.2%(41/56)和 75.0%(42/56),其质谱鉴定准确率优于培养 2、7、9 d 的质谱鉴定准确率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 PDA 培养天数对质谱鉴定曲霉菌能力的影响(n)

曲霉菌株	n	2 d		3 d		5 d		7 d		9 d	
		种	属	种	属	种	属	种	属	种	属
烟曲霉菌	32	8	13	12	13	10	15	3	13	0	13
黄曲霉菌	10	2	4	3	3	4	3	0	5	0	4
黑曲霉菌	14	4	5	6	4	5	5	2	5	1	5
种属		14	22	21	20	19	23	5	23	1	20

3 讨 论

在治疗曲霉菌感染的患者时,获取准确的病原菌信息至关重要,因为不同的曲霉菌对药物的灵敏度不同,有的甚至存在天然耐药。如大部分曲霉菌对两性霉素 B 敏感,而土曲霉菌对两性霉素 B 天然耐药,黄曲霉菌可以出现获得性耐药^[7-8]。因此指导临床合理使用抗真菌药物,必须准确快速地鉴定曲霉菌到种。

曲霉菌现有鉴定方法包括传统手工法、分子测序、MALDI-TOF MS 技术等。分子测序为丝状真菌鉴定的金标准,但是它对操作人员技术要求高,操作复杂,费用昂贵,不适合成为实验室常规的检测方法^[9];曲霉菌传统手工法鉴定需要数天时间,对菌落的生长速度、色素变化及镜下菌丝和孢子结构进行观察,要求检验人员有专业的技术和丰富的鉴定经验,易产生较大的人为误差,本实验室对 56 株曲霉菌采用传统手工法鉴定到种准确率只能达到 57.1% (32/56),与相关研究结果一致^[10]。近年来 MALDI-TOF MS 技术已广泛用于细菌的鉴定^[10-11],操作简便、快速、高通量、且准确性高,临床应用取得良好效果。

MALDI-TOF MS 是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^[12-13]。在真菌的快速鉴定中,近年张霄霄等^[14]发现 MALDI-TOF MS 技术可将酵母样真菌的鉴定准确率从传统手工法的 79.6% 提高到 95.1%。SLEIMAN 等^[15]结合德国布鲁克 MALDI-TOF MS 丝状真菌数据库和实验室自建 18 种曲霉菌谱图,将曲霉菌种鉴定准确率提高了 24.0%,对传统手工法仅鉴定到属的曲霉菌株均实现了种鉴定。上述研究表明,MALDI-TOF-MS 技术在临床真菌鉴定中的作用日益显著,然而质谱技术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,目前仍处于探索阶段。本研究从临床分离出 56 株曲霉菌,对比传统手工法和 MALDI-TOF MS 技术,结果显示,以分子测序结果为金标准,MALDI-TOF MS 技术鉴定丝状真菌到种的准确率为 92.9%,明显高于传统手工法鉴定的 57.1% ($P < 0.05$)。

在 MALDI-TOF MS 技术运用中,布鲁克公司丝状真菌数据库基于液体法建立,认为曲霉菌在液体培养法中采谱能得到更高鉴定准确率。本研究首先比较了 PDA 液体培养水平和竖直两种振荡方式得到的菌丝结果,发现水平振荡获得菌丝更为均匀和细致;再比较了 PDA 固体培养 72 h 和 PDA 液体培养水平振荡 24 h 两种方式,得到的菌丝质谱鉴定到种属的鉴定准确率分别为 73.2% 和 92.9%,两种采谱方法比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),采用 PDA 液体水平振荡培养 24 h 取得的质谱图更优。曲霉菌质谱蛋白的提取法分为完整细胞法和细胞裂解法。甲酸萃取法为完整细胞法,郜珠研磨法属于细胞裂解法,VITEK MS 质谱仪推荐的丝状真菌质谱分析前处理的蛋白质提取方法为甲酸乙腈法^[16]。宗来斌等^[17]采用甲酸乙腈萃取法对 47 株曲霉菌进行前处理后,质谱鉴定准确率为 79.8%;本研究采用郜珠研磨法加上甲酸乙腈萃取法,质谱鉴定准确率达 92.8%,且本法

获得的质谱图特征峰数量更多,强度更高。分析原因可能是:(1)提取过程中加入一定量郜珠,可与菌丝相互碰撞、剪切,使蛋白质释放更为充分,一定程度上提高了难破碎菌株的蛋白图谱质量与鉴定效果;(2)PDA 水平振荡培养 24 h 得到的真菌丝的壁较薄且均匀,郜珠震荡更容易破壁,因而甲酸乙腈萃取到的核酸蛋白更多。

丝状真菌的胞壁坚韧、难以破碎,常规方法难以获得足量蛋白质。影响真菌蛋白质获取的因素除提取方法外,还包括培养基选择、提取蛋白时间等^[18]。真菌常用的培养基有沙堡弱葡萄糖琼脂(SDA)、察氏培养基(CA)和 PDA。DE CAROLIS 等^[19]的研究表明不同培养基(SDA、MA 或 PDA)对 MALDI-TOF MS 的鉴定结果无影响。因此本研究选用 PDA 对 56 株曲霉菌进行培养,并分别在 2、3、5、7、9 d 提取真菌蛋白,运用 MALDI-TOF MS 进行采谱,结果培养 3 d 和 5 d 的质谱鉴定准确率分别为 73.2% 和 75.0%,优于培养 2、7、9 d 的鉴定准确率,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。因此将 PDA 平板培养丝状真菌提取蛋白时间定于 3~5 d。

综上所述,本着丝状真菌鉴定准确、快速和安全的原则,本研究摸索出一套适合本实验室的操作方法:呼吸道或耳鼻喉分泌物标本培养 3~5 d,期间发现曲霉菌菌落可以挑取菌丝于 PDA 液体培养基中水平振荡培养 24 h,所得菌丝采取郜珠研磨,甲酸乙腈萃取蛋白,MALDI-TOF MS 采谱鉴定。此方法操作简单、快速、结果准确且重复性好,完全可以满足临床需要,已在本实验室得以应用,并适于在临床微生物实验室中推广。相信将来 MALDI-TOF MS 技术在各临床实验室中应用会越来越广泛,并逐渐取代传统手工形态学鉴定方法。

参考文献

- [1] 徐媛,陈敏,廖万清,等.中国侵袭性曲霉菌病流行病学现状[J].中国真菌杂志,2018,13(1):57-60.
- [2] 何小羊,任秋霞,杨英,等.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] 尚红,王毓三,申子渝.全国临床检验操作规程[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2015:581.
- [4] 张伟伟,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.
- [5] 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.
- [6] 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].中华实验和临床感染病杂志,2020,14(5):374-379.
- [7] 粟慧琳,陈宗倩,朱均昊,等.1 935 例深部曲霉临床分离株资料回顾性分析[J].中国真菌学杂志,2019,14(4):

217-221.

- [8] 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.
- [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): 514-528.
- [10] 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.
- [11] JANG K S, KIM Y H. Rapid and robust MALDI-TOFMS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications[J]. J Microbiol, 2018, 56(4): 209-216.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.

- [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] 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]. 中华医学杂志, 2017, 97(30): 2379-2383.
- [17] 宗来斌, 吕火焯. MALDI-TOF MS 技术在侵袭性丝状真菌快速鉴定中的应用[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(3): 289-294.
- [18] 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.
- [19] DE CAROLIS E, VELLA A, VACCARO L, et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology[J]. J Infect Dev Ctries, 2014, 8(9): 1081-1088.

(收稿日期: 2023-03-10 修回日期: 2023-09-18)

• 短篇论著 •

代谢相关因素与男性痤疮的关系研究*

姜媛¹, 关凤军², 韩正祥³, 贾琼⁴, 张昕博^{1△}

1. 南京医科大学附属南京医院/南京市第一医院皮肤科, 江苏南京 210006; 2 徐州医科大学附属医院儿科, 江苏徐州 221004; 3. 徐州医科大学附属医院肿瘤科, 江苏徐州 221004; 4. 南京医科大学附属南京医院/南京市第一医院肿瘤科, 江苏南京 210006

摘要:目的 分析代谢综合征与男性痤疮的关系, 并甄别与痤疮相关的代谢相关危险因素。方法 选取 2021 年 2 月至 2022 年 4 月于南京医科大学附属南京医院就诊的男性痤疮患者 150 例为观察组, 150 例年龄性别相当的健康男性为对照组; 收集并比较两组一般资料, 采用 Logistic 回归分析代谢综合征与男性痤疮的关系。结果 观察组患有代谢综合征 46 例(30.67%); 多因素 Logistic 回归分析结果表明, 吸烟、高血压、腰围和空腹血糖分别使痤疮发生风险增加 27.433 倍、1.100 倍、1.090 倍和 5.835 倍; 痤疮分级与高血压关系更密切。结论 吸烟、高血压、腰围和空腹血糖是男性痤疮发生的重要危险因素, 有必要对可能导致代谢综合征发生的男性痤疮患者的相关参数进行深入检查和监测。

关键词: 痤疮; 代谢综合征; Logistic 回归分析; 血糖

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.23.025

文章编号: 1673-4130(2023)23-2941-04

中图法分类号: R751.05

文献标志码: A

痤疮是一种主要影响青少年的慢性炎症性皮肤病, 是主要累及毛囊皮脂腺的常见皮肤问题之一^[1-2]。因其影响外观, 对患者的心理健康和生活质量有重大的影响^[3]。它是一种多因素疾病, 主要病因包括雄激素水平升高, 毛囊皮脂腺单位内的细菌(主要是痤疮丙酸杆菌)的定植增加, 毛囊皮脂腺导管的

异常角化过度, 皮脂生成增加等, 上述因素最终导致机体释放几种促炎介质, 如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 8 和白细胞介素 10, 从而激活胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 和雷帕霉素复合物 1 (mTORC1) 信号通路^[2-4]。而肥胖、2 型糖尿病、胰岛素抵抗等代谢异常性疾病却可被 mTORC1 信号通路

* 基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20200146)。

△ 通信作者, E-mail: 1780441489@qq.com。