

色结果表明食积大鼠的胃窦和十二指肠均无器质性变化。这表明本研究已成功构建食积大鼠模型。

体质量和进食量结果表明, 余甘露治疗明显改善食积大鼠体质量增加缓慢和进食量减少的症状。胃残留率和肠推进率结果表明, 实验组和阳性对照组与模型恢复组相比均有一定的差异, 且实验组和阳性对照组的实验结果相当。这说明食积大鼠经余甘露治疗后, 大大地改善了食积大鼠腹胀、食满的症状, 具有促进肠胃蠕动的功效。上述结果表明, 余甘露具有较好的治疗食积大鼠的功效。

为初步探究余甘露治疗食积大鼠的作用机制, 本研究检测了各组大鼠血清中 MTL、SP、Ghrelin、SS 和 VIP 的含量变化。本研究实验结果表明, 与模型恢复组相比, 经余甘露治疗后的食积大鼠血清中的 MTL、SP 和 Ghrelin 水平升高, 其中以 Ghrelin 尤为明显, 而 VIP 和 SS 的水平降低, 尤其 SS。这表明余甘露治疗食积大鼠的作用机制可能与调节大鼠血清中 MTL、SP、Ghrelin、VIP 和 SS 的水平, 促进胃肠动力有关。

综上, 本研究根据福州民间传统方法制备了余甘露, 并构建了食积大鼠模型, 初步探讨了其治疗食积大鼠的作用机制, 为后续研发余甘子相关食积成药提供了理论依据以及临床前研究资料。

## 参考文献

- [1] 钟益宁. 余甘子叶有效化学成分及其抗肿瘤作用的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.
- [2] 余朝辉, 郑珊娇. 白积养胃汤对功能性消化不良大鼠血清和组织中 MTL、GAS 和 VIP 含量的影响 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31 (4): 200-201.
- [3] 江垵霓, 王冬妮, 吴浩忠, 等. 广东神曲对食积小鼠胃肠动力及 Cx43、BDNF 的调节影响 [J]. 中南药学, 2023, 21 (9): 2269-2274.
- [4] 甄建华, 李晓菲, 于河, 等. 谷晓红食积因素对昆明小鼠血清 IgA 及肺脏与结肠组织 SIgA、SP、VIP 含量的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (9): 3862-3865.
- [5] 李淑婷, 吴黎, 杨家霖, 等. 小儿感冒宁颗粒对脾虚型功能性消化不良大鼠胃肠运动及血清胃肠激素水平的影响 [J]. 中国现代中药, 2023, 25 (10): 2219-2127.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1082-1083.
- [7] 王丽芳, 高文远, 徐鑫, 等. 神曲鲜干品组方对食积小鼠胃肠动力及肠道菌群调整的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (4): 20-24.
- [8] 方肇勤. 大鼠/小鼠辨证论治实验方法学 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2009: 100.
- [9] 邢建峰, 封卫毅, 侯家玉. 小鼠胃排空及小肠推进实验方法的探讨 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26 (4): 50-52.
- [10] 汪受传. 中医儿科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 15, 110.

## • 基础研究 •

# MALDI-TOF MS 技术鉴定皮肤癣菌的可行性分析

陆璇<sup>1</sup> 郭建<sup>2</sup> 韩智庆<sup>1</sup> 简勇进<sup>1</sup> 黄惠明<sup>1</sup> 洪和泉<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 探讨基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 技术在临床鉴定皮肤癣菌的应用价值及其可行性。方法 使用 MALDI-TOF-MS 鉴定 113 株皮肤癣菌, 鉴定结果与传统形态学鉴定方法和多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 鉴定结果进行比较, 评价 MALDI-TOF MS 鉴定技术对皮肤癣菌的鉴定情况。结果 使用 MALDI-TOF-MS 技术鉴定 113 株皮肤癣菌, 与传统形态学鉴定方法和 MLST 结果相比, 106 株 (93.8%) 正确鉴定到种水平, 7 株 (6.2%) 鉴定错误。其中红色毛癣菌的鉴定结果正确率达到 96.3%, 须癣毛癣菌复合群的鉴定正确率达到 91.5%。结论 目前, MALDI-TOF-MS 技术对皮肤癣菌鉴定准确性高, 可较准确鉴定出临床常见的红色毛癣菌和须癣毛癣菌复合群。

**【关键词】** 皮肤癣菌; MALDI-TOF-MS; 鉴定

**【中图分类号】** R446.5 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2024)02-0125-04

基金项目: 漳州市自然科学基金资助项目 (ZZ2021J12)

作者单位: 1 福建省漳州市皮肤病防治院, 漳州 363000; 2 同济大学附属东方医院, 上海 200120

通信作者: 洪和泉

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.02.034

皮肤癣菌是一类丝状真菌，可侵犯人和动物的角化组织，引起皮肤癣菌病，是最常见的浅表真菌感染之一，影响全球约 1/4 的人口<sup>[1]</sup>。近年来，由皮肤癣菌引起的感染发病率增加，难以治疗的病例数量也随之增加，这表明皮肤癣菌病仍然是一个具有挑战性的公共卫生问题<sup>[2]</sup>。在亚洲地区的大多数国家，红色毛癣菌和须癣毛癣菌复合体是引起皮肤癣菌病和指甲感染最重要的两种皮肤癣菌<sup>[3-4]</sup>。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 具有高效、简便、准确、低成本的特性。目前，MALDI-TOF-MS 技术在常规实验室大多数微生物的鉴定中已成为了金标准，并在很大程度上取代了譬如生化检测这类传统的鉴定方法。本研究选取皮肤癣菌中最常见的两个种属进行 MALDI-TOF-MS 技术应用评价，探讨该技术用于临床鉴定皮肤癣菌的可行性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种来源

共收集皮肤癣菌 113 株。所有菌株均分离自我院皮肤科真菌感染患者。将病人皮屑或毛发等标本，一部分经浓度为 10% 的氢氧化钾 (KOH) 溶解后镜检，另一部分接种至含有放线菌酮和氯霉素

的沙保罗培养基 (sabouraud dextrose agar, SDA)，放至 25 °C 恒温培养箱培养 1~2 周。菌株均采用 MLST 测序技术准确鉴定到种水平。质控菌株为红色毛癣菌 ATCC4438。

### 1.2 仪器与试剂

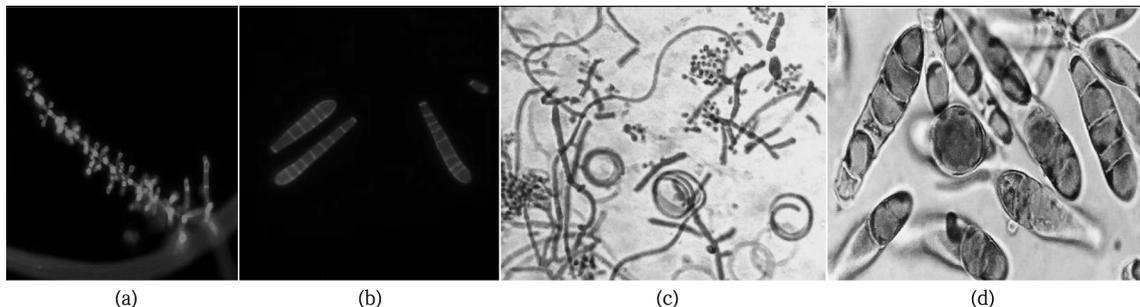
基质辅助激光解吸离子源-飞行时间质谱仪 EXS3000 (中元汇吉生物技术股份有限公司)；微生物质谱系统霉菌样本预处理试剂盒 (中元汇吉生物技术股份有限公司)。沙保罗培养基 (郑州贝瑞特生物技术有限公司)，马铃薯培养基 (郑州安图生物股份有限公司)。

### 1.3 真菌数据库

采用中元汇吉生物技术股份有限公司真菌自建库，自建库菌种来源为标准菌株以及各医院合作收集的临床菌株。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 传统形态学鉴定** 将临床菌株从 SDA 培养基转种至马铃薯培养基 (potato dextrose agar, PDA) 25 °C 恒温箱中孵育 7 d 左右，待菌落成熟后用透明胶带粘取菌落中心，贴在滴有乳酸酚棉兰或钙白荧光染液的玻片上，显微镜下观察其大小分生孢子形态，鉴定菌种。



注：(a) 红色毛癣菌泪滴状小分生孢子 (×400, 钙白荧光染色)；(b) 红色毛癣菌铅笔状大分生孢子 (×400, 钙白荧光染色)；(c) 须癣毛癣菌复合群螺旋状菌丝 (×400, 乳酸酚棉兰染色)；(d) 须癣毛癣菌复合群大分生孢子 (×400, 乳酸酚棉兰染色)。

图 1 红色毛癣菌与须癣毛癣菌复合群显微镜下特征

**1.4.2 MLST 测序鉴定** 利用 EF1 $\alpha$ 、 $\beta$ -tubulin、ITS 多对基因对菌株进行 MLST 分析；电泳测序后将样品序列与 Mycobank Database 中的已知序列进行比对，鉴定出菌种。

**1.4.3 MALDI-TOF-MS 技术鉴定** 向霉菌提取管中加入 200  $\mu$ L 霉菌提取试剂 I 和 200  $\mu$ L 霉菌提取试剂 II；将取样棉签浸入混合提取试剂中；用取样棉签刮取 SDA 平板上新鲜培养的菌体，涮入提取

液中，反复几次直至溶液浑浊；涡旋振荡混匀，无需离心，滴加 1  $\mu$ L 悬浊液于样本靶，干燥后滴加 1  $\mu$ L 基质溶液覆盖样本，干燥后上机检测。分值 >2 分为结果可信。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析，计数资料以例数或百分率表示，组间比较采用  $\chi^2$  检验，检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 传统形态学鉴定结果

经菌落形态以及显微镜下大小分生孢子形态特征鉴定,共鉴定出 58 例红色毛癣菌;52 例须癣毛癣菌复合群;3 例断发毛癣菌。

### 2.2 MLST 测序结果

54 例红色毛癣菌;59 例须癣毛癣菌复合群(23 例须癣毛癣菌,36 例趾间毛癣菌)。

### 2.3 MALDI-TOF MS 技术鉴定结果

53 例红色毛癣菌(52 例分值 $>2$ 分);26 例须癣毛癣菌(分值 $>2$ 分);28 例趾间毛癣菌(分值 $>2$ 分);1 例断发毛癣菌(分值 $>2$ 分);5 例结果不置信(分值 $<2$ 分)。

### 2.4 3 种方法学鉴定结果比较

以 MLST 测序技术为 113 例皮肤癣菌鉴定标准,将传统形态学鉴定结果和 MALDI-TOF-MS 技术鉴定结果(质谱分值 $>2$ 分)与之相比较,得出菌种鉴定的准确率分别为:红色毛癣菌 94.4% (51/54),96.3% (52/54), $P>0.05$ ,两者鉴定准确率差异无统计学意义;须癣毛癣菌复合群 88.1% (52/59),91.5% (54/59), $P>0.05$ ,两者鉴定准确率差异无统计学意义。

## 3 讨论

MALDI-TOF-MS 技术正在以极其迅猛的发展速度成为目前临床微生物学实验室鉴定的金标准。除了微生物的常规鉴定以外,单一菌株的分型以及抗生素和抗真菌药物的耐药性检测也成为了人们关注 MALDI-TOF-MS 技术的焦点。目前,国内对于 MALDI-TOF-MS 技术在丝状真菌的鉴定研究多集中在曲霉和部分侵袭性真菌方面,对于皮肤癣菌鉴定的应用研究仍然较少。

L'OLLIVIER 等<sup>[5]</sup>在一篇综述中描述了从 2008 年至 2015 年间发表的 10 项研究,表明 MALDI-TOF-MS 技术对皮肤癣菌的鉴定准确率从 14% 到 100% 不等,呈现出了极大的不稳定性。而 MALDI-TOF-MS 设备差异、提取处理步骤不统一,数据库质量不同等亦是鉴定结果不稳定的重要因素<sup>[5-8]</sup>。2022 年,在 HAMAL 等<sup>[9]</sup>的研究当中,也指出了 MALDI-TOF-MS 技术在丝状真菌,包括对皮肤癣菌的鉴定存在一定的局限性,提出鉴定丝状真菌的最佳方法是结合形态学特征和 MALDI-TOF-MS 提取方法。

本研究显示,MALDI-TOF-MS 技术对于红色毛癣菌的鉴定准确率达到 96.3%,对于须癣毛癣

菌复合群的鉴定准确率达到 91.5%,对于两者鉴定总准确率为 93.8%。传统形态学鉴定技术,对于红色毛癣菌和须癣毛癣菌复合群鉴定至种水平的准确率为 94.4% 与 88.1%。

传统形态学方法鉴定皮肤癣菌是通过菌落培养,由技术人员观察菌落的宏观形态和显微镜下形态特征进行鉴别分类。在鉴定时间上,通常需要花费 2 周或更长的时间。由于一些物种之间的形态学相似性较高,技术上需要工作经验丰富的人员进行操作,费时费力,且存在一定的错误率。与 MALDI-TOF-MS 技术相比,传统形态学鉴定技术存在耗时长,技术人员要求高,鉴定存在一定主观性等缺点,即使是拥有几十年工作经验的技术人员,鉴定易混淆的几种皮肤癣菌仍有一定的错误率。在 MALDI-TOF-MS 光谱数据库健全的情况下,传统形态学鉴定技术准确率低于 MALDI-TOF-MS 技术;在菌株分型方面,传统形态学也无法通过形态学特征对不同亚型的菌株进行鉴定。目前,MALDI-TOF-MS 光谱数据库没有类似 NCBI Gen Bank 此类通用开放数据库,因此,一部分商业化 MALDI-TOF-MS 鉴定系统的参考光谱库对于皮肤癣菌的鉴定仍然不足以进行常规临床分析<sup>[10]</sup>由于部分皮肤癣菌的分型尚不十分明确。自建库的质量对于鉴定结果准确性的影响很大。实验室需要通过使用内部参考库来扩展制造商参考光谱库,以涵盖种间和种内皮肤癣菌的多样性。目前,MALDI-TOF-MS 鉴定设备厂商均开始注重皮肤癣菌自建库的建设,在国内各真菌学家专业团队的带领下,皮肤癣菌数据库日益完善。本研究使用 MALDI-TOF-MS 技术对临床上常见的两种皮肤癣菌进行鉴定验证,均表现出了良好的准确率。MALDI-TOF-MS 技术在临床皮肤癣菌快速鉴定方面展现了良好的前景。未来关于 MALDI-TOF-MS 技术对于皮肤癣菌的应用将是直接从临床样品中提取鉴定皮肤癣菌,更快更准确地为皮肤癣菌的流行病学及耐药研究提供新的见解。

### 参考文献

- [1] HAVLICKOVA B, CZAIIKA VA, FRIEDRICH M, et al. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide [J]. *Mycoses*, 2008, 51 (Suppl 4): 2-15.
- [2] ZAMANI S, SADEGHI G, YAZDINIA F, et al. Epidemiological trends of dermatophytosis in Tehran, Iran: A five-year retrospective study [J]. *J Mycol Med*, 2016, 26 (4): 351-358.

(下转第 139 页)

- changes influenced by tooth movement [J]. *J Periodontol*, 2017, 88 (10): 960-977.
- [10] KAO R T, CURTIS D A, KIM D M, et al. American Academy of Periodontology best evidence consensus statement on modifying periodontal phenotype in preparation for orthodontic and restorative treatment [J]. *J Periodontol*, 2020, 91 (3): 289-298.
- [11] BINDERMAN I, GADBAN N, BAHAR H, et al. Commentary on: periodontally accelerated osteogenic orthodontics (PAOO) - a clinical dilemma [J]. *Int Orthod*, 2010, 8 (3): 268-277.
- [12] MAKKI L, FERGUSON D J, WILCKO M T, et al. Mandibular irregularity index stability following alveolar corticotomy and grafting: a 10-year preliminary study [J]. *Angle Orthod*, 2015, 85 (5): 743-749.
- [13] 陈斌, 闫福华. 牙周辅助加速成骨正畸治疗: 历史、原理、临床应用和展望 [J]. *口腔疾病防治*, 2023, 31 (1): 2-9.
- [14] KIM S J, PARK Y G, KANG S G. Effects of Corticision on paradental remodeling in orthodontic tooth movement [J]. *Angle Orthod*, 2009, 79 (2): 284-291.
- [15] DIBART S, SEBAOUN J D, SURMENIAN J. Piezocision: a minimally invasive, periodontally accelerated orthodontic tooth movement procedure [J]. *Compend Contin Educ Dent*, 2009, 30 (6): 342-344, 346, 348-350.
- [16] KIM Y S, KIM S J, YOON H J, et al. Effect of piezopuncture on tooth movement and bone remodeling in dogs [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2013, 144 (1): 23-31.
- [17] 曹阳, 赵转浓. 骨皮质切开辅助正畸治疗的临床研究进展 [J]. *口腔疾病防治*, 2018, 26 (4): 205-210.
- [18] COSCIA G, COSCIA V, PELUSO V, et al. Augmented corticotomy combined with accelerated orthodontic forces in class III orthognathic patients: morphologic aspects of the mandibular anterior ridge with cone-beam computed tomography [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2013, 71 (10): 1760. e1-9.
- [19] LIU X, FAN B, ABDELREHEM A, et al. Membrane fixation for osseous graft stabilization in periodontally accelerated osteogenic orthodontics: a comparative study [J]. *BMC Oral Health*, 2020, 20 (1): 22.
- [20] MA Z G, YANG C, XIE Q Y, et al. A Novel Surgical Technique for Augmented Corticotomy-Assisted Orthodontics: Bone Grafting With Periosteum [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2016, 74 (1): 170-180.

## (上接第 127 页)

- [3] OSMAN M, KASIR D, RAFEI R, et al. Trends in the epidemiology of dermatophytosis in the Middle East and North Africa region [J]. *Int J Dermatol*, 2022, 61 (8): 935-968.
- [4] SAHOO A K, MAHAJAN R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review [J]. *Indian Dermatol Online J*, 2016, 7 (2): 77-86.
- [5] L'OLLIVIER C, RANQUE S. MALDI-TOF-Based Dermatophyte Identification [J]. *Mycopathologia*, 2017, 182 (1/2): 183-192.
- [6] HEDAYATI M T, ANSARI S, AHMADI B, et al. Identification of clinical dermatophyte isolates obtained from Iran by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Curr Med Mycol*, 2019, 5 (2): 22-26.
- [7] 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: 电子版*, 2020, 14 (5): 374-379.
- [8] 彭雨萌, 宗来斌, 董晓燕, 等. 两种丝状真菌前处理试剂在质谱鉴定中的比较 [J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42 (22): 2810-2812, 2816.
- [9] HAMAL P, VAVROVA A, MRAZEK J, et al. Identification of filamentous fungi including dermatophytes using MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2022, 67 (1): 55-61.
- [10] SCHUBERT S, KOSTRZEWA M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2017, 23: 17-20.

## (上接第 130 页)

- [10] 颜学侠, 蔡怡嘉. 福州家庭医生签约现状及对策研究 [J]. *中国继续医学教育*, 2018, 10 (15): 44-46.
- [11] 王鑫, 张艳春, 秦江梅, 等. 家庭医生签约服务模式下全科医疗核心特征功能对患者就诊满意度的影响——以河南省 J 县为例 [J]. *中国初级卫生保健*, 2023, 37 (1): 22-25.
- [12] 吴彩芬. 基层医疗卫生人才队伍建设的探索与思考 [J]. *中国农村卫生*, 2023, 15 (11): 49-52.
- [13] 匡莉, LI L, 梅洁. 全科医疗核心特征功能、高绩效作用机制及其政策涵义 [J]. *中国卫生政策研究*, 2016, 9 (1): 2-10.
- [14] 邓栩明, 伍世骏, 林晓欣, 等. 基层卫生服务患者满意度调查 [J]. *解放军医院管理杂志*, 2017, 24 (2): 111-114.
- [15] 孙杨, 胡一兵, 胡文嘉, 等. 基于诊疗价值构建基本医保守门人制度 [J]. *中国卫生*, 2023, (4): 58-61.