

# 不同鉴定方法在酵母样真菌鉴定中的应用

李仕杰 钟俊东 孔雪莹 陈海扬 梁炬斌

东莞市妇幼保健院 广东 东莞 523000

**【摘要】目的：**探究不同鉴定方法在酵母样真菌鉴定中应用效果。**方法：**选取我院2020年1—12月临床各种标本分离培养后酵母样真菌总计211株作为研究对象，分别采取念珠菌显色平板（迪景公司、安图公司）、ATB微生物鉴定仪、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析三种方式开展鉴定，并分析不同方式的鉴定性能。**结果：**211株酵母样真菌鉴定结果中，念珠菌显色平板（迪景公司）、念珠菌显色平板（安图公司）、ATB鉴定仪和质谱鉴定仪均以白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌的检出率较高。ATB鉴定仪和质谱鉴定仪鉴定中，酿酒酵母菌的检出率较高，分别为30株（14.2%）和54株（25.6%）。念珠菌显色平板（迪景公司）和念珠菌显色平板（安图公司）鉴定中，不可鉴定的菌分别为21株（10.0%）和60株（28.4%）。ATB鉴定仪、质谱鉴定仪对酵母样真菌鉴定种类数高于念珠菌显色平板（迪景公司）、念珠菌显色平板（安图公司），差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；ATB鉴定仪、质谱鉴定仪鉴定种类上差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。**结论：**在酵母样真菌鉴定中，念珠菌显色平板有一定局限性，ATB微生物鉴定仪、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析均具有较高鉴定菌种能力；但在疑难菌种鉴定时，基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析可作为确诊方法，且具有操作简单、快速及稳定可靠优点。

**【关键词】** 酵母样真菌；ATB ID32C 鉴定；基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析

**【中图分类号】** R446.6

**【文献标识码】** B

**【文章编号】** 2096-1685(2022)10-0081-03

近年来，临床对广谱抗菌药物、免疫抑制剂及激素等操作的广泛应用，造成深部真菌感染率偏高，而在引入新抗真菌药物、临床实践改变的背景下，整体发病率、病死率及医疗成本仍呈现居高不下的状态，真菌感染中假丝酵母菌占比偏高<sup>[1]</sup>。当前对深部真菌常规鉴定中，耗费时间长、操作繁琐，目前因受技术条件、成本效益等因素的影响，分子生物学方法难以常规开展，不利于临床快速鉴定菌种并指导临床合理用药<sup>[2]</sup>。因此，当前选择合理、有效的鉴定方法，可进一步防治临床深部真菌感染<sup>[3]</sup>。目前临床鉴别酵母样真菌种类常见为念珠菌显色平板、ATB微生物鉴定仪、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析三种方式，为进一步深入分析，文章针对上述三种鉴定结果进行分析，现报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取我院2020年1—12月临床各种标准分离培养后酵母样真菌总计211株作为研究对象，所有培养样本应用甘油培养液取沙保培养基或显色平板上单菌落，一式四份置入EP管内，放入-70℃冰箱中保存。其中男性63例，女性148例；年龄1~96岁，平均年龄（45.63±4.45）岁。菌株来源的标本类型主要包括阴道分泌物114例，大便66例，痰液23例，耳脓液2例，口腔脓液2例，腹腔引流物1例，静脉导管1例，脓液1例，胃液1例。

### 1.2 设备与材料

1.2.1 仪器与试剂 选择法国生物梅里埃公司生产的全自动微生物质谱检测系统VITEK MS、Bact/ALERT 3D 240全自动血培养仪和ATB半自动微生物鉴定仪；郑州安图生物工程股份有限公司（安图公司）的哥伦比亚血琼脂平板、沙

保弱培养基、念珠菌显色平板和广州迪景微生物科技有限公司（迪景公司）的念珠菌显色平板；法国生物梅里埃酵母菌鉴定试剂条ID 32 C、靶板、VITEK MS CHCA Matrix（VITEK MS-CHCA 基质）和VITEK MS-FA（VITEK®MS Formic Acid，甲酸）。

1.2.2 标准菌株质量控制 采取白假丝酵母ATCC14053、近平滑假丝酵母ATCC22019、光滑假丝酵母ATCC MYA-2950、热带假丝酵母ATCC4563和克柔假丝酵母ATCC6258质控菌株为卫生部临床检验中心提供。

### 1.3 方法

遵循《全国临床检验操作规程》第四版常规方法进行分离培养：腹水、引流液等无菌体液标本操作接种于培养瓶内，经Bact/ALERT 3D 240全自动血培养进行培养，阳性报警后涂片观察并转接种于沙保弱培养基上。痰液、尿液及分泌物等直接接种于沙保弱培养基、血平板上，放入35℃孵育箱培养18~24h通过菌落观察及涂片进行初步鉴定。

念珠菌显色平板（迪景公司、安图公司）：取沙保弱平板或血平板上单个菌落，划线法接种于念珠菌显色平板（迪景公司、安图公司）中，35℃培养24h后观察颜色变化。根据公司的培养基说明书上依据颜色进行辨别。迪景公司：绿色菌落为白假丝酵母菌，蓝色菌落为热带假丝酵母菌，紫红色为光滑假丝酵母菌，粉红色边缘模糊有微毛为克柔假丝酵母菌，其他颜色及不显色为其他假丝酵母菌。安图公司：绿色或翠绿色菌落为白假丝酵母菌，灰蓝色到铁蓝色菌落为热带假丝酵母菌，奶油色到白色为光滑假丝酵母菌，紫色边缘模糊有微毛为克柔假丝酵母菌，其他颜色及不显色为其他假丝酵母菌，针对颜色不典型者延长培养时间观察。ATB微生物鉴定仪：遵循ATB真

菌鉴定的操作要求,并采取 ID 32 C 真菌鉴定卡条进行真菌鉴定。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析:挑取菌落均匀涂于靶板上,先加 0.5μL 甲酸裂解酵母菌细菌壁,待干后加入 1μL 的 CHCA 基质,室温干燥并进样,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱评分鉴定,每个菌株在靶板点样到质谱分析重复检测 2~3 次,取其质谱检测最高分进行数据评估得出鉴定结果。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 *t* 检验,计数资料用百分率 (%) 表示,采用  $\chi^2$  检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 211 株酵母样真菌鉴定结果

211 株酵母样真菌鉴定结果中,念珠菌显色平板(迪景公司)、念珠菌显色平板(安图公司)、ATB 鉴定仪和质谱鉴定仪均以白假丝酵母菌为主,分别为 90 株 (42.7%)、92 株 (43.6%)、89 株 (42.2%) 和 89 株 (42.2%),四组比较差异无统计学意义 (*P*>0.05)。在其他三种常见酵母样真菌的鉴定中,光滑假丝酵母菌的检出率较高,分别为 86 株 (40.8%)、37 株 (17.5%)、50 株 (23.7%) 和 34 株 (16.1%),差异有统计学意义, *P*<0.05。热带假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌的检出率均较低,均< 5%,四组数据比较差异均无统计学意义 (*P*>0.05)。ATB 鉴定仪和质谱鉴定仪鉴定中,酿酒酵母菌检出率较高,分别为 30 株 (14.2%) 和 54 株 (25.6%)。念珠菌显色平板鉴定中,迪景公司和安图公司的不可鉴定率分别为 21 株 (10.0%) 和 60 株 (28.4%)。详见表 1。

表 1 211 株酵母样真菌鉴定结果 [n(%)]

顺序	种类	念珠菌显色平板 (迪景厂家)	念珠菌显色平板 (安图厂家)	ATB 鉴定仪	质谱鉴定仪	
1	白假丝酵母菌	90(42.7%)	92(43.6%)	89(42.2%)	89(42.2%)	<i>P</i> =0.95
2	光滑假丝酵母菌	86(40.8%)	37(17.5%)	50(23.7%)	34(16.1%)	<i>P</i> <0.05
3	热带假丝酵母菌	6(2.8%)	7(3.3%)	7(3.3%)	8(3.8%)	<i>P</i> =0.78
4	克柔假丝酵母菌	5(2.4%)	10(4.7%)	4(1.9%)	11(5.2%)	<i>P</i> =0.09
5	酿酒酵母菌	0	0	30(14.2%)	54(25.6%)	—
6	霍尔姆假丝酵母菌	0	0	10(4.7%)	0	—
7	清酒假丝酵母菌	0	0	9(4.3%)	0	—
8	近平滑假丝酵母菌	0	0	3(1.4%)	6(2.8%)	—
9	都柏林假丝酵母菌	0	0	3(1.4%)	2(0.9%)	—
10	阿沙丝孢酵母菌	0	0	0	3(1.4%)	—
11	似平滑假丝酵母菌	0	0	0	2(0.9%)	—
12	粗状假丝酵母菌	0	0	2(0.9%)	0	—
13	埃切德酵母菌	0	0	1(0.5%)	0	—
14	接合酵母菌	0	0	1(0.5%)	0	—
15	日本克勒酵母菌	0	0	1(0.5%)	0	—
16	头状地酶菌	0	0	1(0.5%)	0	—
17	高里假丝酵母菌	0	0	0	1(0.5%)	—
18	类皱落假丝酵母菌	0	0	0	1(0.5%)	—
19	不可鉴定	21(10.0%)	60 (28.4%)	—	—	—
20	不生长	3(1.4%)	5(2.4%)	—	—	—

2.2 四种鉴定方式在酵母样真菌鉴定种类分析

ATB 鉴定仪、质谱鉴定仪对酵母样真菌鉴定种类数高于念珠菌显色平板(迪景公司)、念珠菌显色平板(安图公司),差异有统计学意义 (*P*<0.05);ATB 鉴定仪、质谱鉴定仪鉴定种类上差异无统计学意义 ( $\chi^2=1.129, P>0.05$ )。详见表 2。

表 2 四种鉴定方式在酵母样真菌鉴定种类分析 (*n*=20)

组别	种类
念珠菌显色平板 (迪景厂家)	4
念珠菌显色平板 (安图厂家)	4
ATB 鉴定仪	14
质谱鉴定仪	11
$\chi^2$	15.835
<i>P</i>	0.001

3 讨论

当前随着激素、免疫抑制剂等广谱抗生素在临床广泛应用,免疫功能低下人群数量逐年递增,因真菌所致感染日益增

多。危重症及免疫低下患者中,深部真菌感染会导致其病死率上升。对真菌感染诊断现状进行分析,无法满足临床对早期诊断需求,多数患者会延误病情,造成治疗失败甚至死亡<sup>[4]</sup>。目前显色平板为一类常见干预方式,在酵母菌分离鉴定中,具有抑制杂菌强、结果鲜明、操作简便、混合感染可一目了然等特点,但针对部分特殊真菌仍无法进行检测及鉴定,整体准确率偏低,不利于后期诊疗方案确定,影响患者后期康复<sup>[5]</sup>。

质谱技术是将待检测样品经诱导碰撞转化为运动的气态离子碎片,按照质荷比大小顺序排列而形成图谱的一项检测技术。质谱仪是一类能促使物质离子离化成离子,并通过适当的电场、磁场将其按照空间位置、时间先后或轨道稳定与否实现质荷比分离,检测其强度并开展样本分析的仪器<sup>[6]</sup>。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱作为质谱中一类常见技术,是近年来微生物实验室广泛应用于细菌、真菌快速鉴定的有效方法。念珠菌显色平板培养法、生化鉴定法,其菌种鉴定结果的时间

过长,无法满足临床需要。显色培养基直接根据颜色的变化进行鉴定,但本身该类方式应用具有局限性,且菌落颜色会因不同人的情况在鉴定上存在一定差异或菌落显色不显著造成鉴定错误现象。当前研究指出<sup>[7]</sup>,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱对常见假丝酵母菌,如白假丝酵母菌、克柔假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌等鉴定准确率较高。也有研究指出<sup>[8]</sup>,鉴定83例标准菌和分离自临床皮损的是以念珠菌为主的酵母菌,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱中仅出现5例与内转录间隔区测序结果不一致。有学者研究指出<sup>[9]</sup>,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱对酵母菌与类酵母菌的鉴定准确率为92.5%~99.5%,且可区分一些表型相似而基因型不同的菌株。上述研究开展中均证实基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术应用于酵母菌检测中准确率较高,且具有速度快、结果可靠等优势,可满足于临床快速鉴定需求<sup>[10]</sup>。

本次研究中,笔者为探讨不同鉴定方法在酵母样真菌鉴定中效果,选取我院211例不同标本开展鉴定,分别采取念珠菌显色平板、ATB微生物鉴定仪、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析三种方式,其中念珠菌显色平板分别购自迪景公司和安图公司。对上述四种鉴定情况分析得出:念珠菌显色平板(迪景公司)、念珠菌显色平板(安图公司)、ATB鉴定仪和质谱鉴定仪均以白假丝酵母菌为主,分别为90株(42.7%)、92株(43.6%)、89株(42.2%)和89株(42.2%),四组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。在其他3种常见的酵母样真菌的鉴定中,光滑假丝酵母菌的检出率也较高,分别为86株(40.8%)、37株(17.5%)、50株(23.7%)和34株(16.1%),差异有统计学意义, $P<0.05$ 。热带假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌的检出率均较低,均低于5%,四组差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。ATB鉴定仪和质谱鉴定仪鉴定中,酿酒酵母菌检出率较高,分别为30株(14.2%)和54株(25.6%)。念珠菌显色平板鉴定中,迪景公司和安图公司的不可鉴定率分别为21株(10.0%)和60株(28.4%)。念珠菌显色平板在四种酵母样真菌的鉴定中,白假丝酵母菌、热带假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌筛查效果良好,但针对光滑假丝酵母菌的鉴定效果较差;其中两种厂家中,安图公司显色平板效果与质谱鉴定仪的结果更为接近。从表2鉴别酵母菌种类分析中得出,ATB鉴定仪、质谱鉴定仪对酵母样真菌鉴定种类数高于念珠菌显色平板(迪景公司)、念珠菌显色平板(安图公司),差异有统计学意义( $P<0.05$ );ATB鉴定仪、质谱鉴定仪鉴定种类上差异无统计学意义( $P>0.05$ )。ATB鉴定仪、质谱鉴定仪鉴定结果得出,两者均具备良好鉴别其他菌种效果,但临床更推荐应用质谱鉴定仪进行鉴定,因该检测技术具有操作简单、稳定可靠等特点,更方便快速出鉴定结果,且花费时间、金钱更少。当前临床筛查中,可将显色平板作为普筛,对无法确定菌种采取质谱鉴定仪鉴定结果<sup>[11]</sup>。当前在酵母菌鉴定中质谱技术具有很大的发展前景,简单快速对真菌成分进行分析,但实施中有一定不足,如质谱冲虚性不佳,定量难度较高<sup>[12]</sup>。目前病原真菌相关参考数据完善程度不

足,对丝状真菌鉴定上,对挑取、特殊预处理等环节上需要制订标准化操作流程;另外,培养基、培养时间及产生色素等因素均会对鉴定结果造成影响;针对部分菌株而言,缺乏特异性峰值、峰值数量不足时,无法形成图谱进而无法进行有效鉴定。

综上所述,在酵母样真菌鉴定中,念珠菌显色平板有一定局限性,ATB微生物鉴定仪、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析均具有较高鉴定菌种能力,但对于疑难菌种鉴定时,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析有操作简单、快速及稳定可靠等优点,更适用于临床快速鉴定。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] 杨丹,徐雯慧. 显色培养基对酵母菌MALDI-TOF MS鉴定结果的影响评估[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(18):2736-2740.
- [3] 高兆建,王秋芬,丁飞鸿,等. 广谱拮抗菌株的筛选诱变及抗菌物质分离鉴定[J]. 食品科学, 2021,42(2):143-150.
- [4] 周龙荣,徐元宏. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)分析在丝状真菌实验诊断中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2017,32(1):5-8,105.
- [5] 黄旭纯,黄思贇,陈柳伊,等. 住院肿瘤患者酵母样真菌的菌株分布及药物敏感性分析[J]. 中国医药, 2020, 15(10):1630-1632.
- [6] 栗方,李志荣,赵颖,等. 河北地区侵袭性酵母样真菌的菌株分布及药敏分析[J]. 中国真菌学杂志, 2019,14(4):222-227.
- [7] 赖韶钦,李晓君,谭俊青,等. 932例老年住院患者分离酵母样真菌的分布及药敏分析[J]. 中国真菌学杂志, 2019,14(1):42-44.
- [8] 张敬霞,崔恩博,张鞠玲,等. 肝病患者无菌部位酵母菌感染的临床特征及抗真菌药物的敏感性分析[J]. 中国真菌学杂志, 2020,15(1):15-21.
- [9] 俞建玉. 抗真菌药物与乳杆菌制剂联合及序贯应用治疗68例重度外阴阴道假丝酵母菌病的效果分析[J]. 中外医学研究, 2019,17(21):120-122.
- [10] 刘文静,孙宏莉,张小江,等. 2014—2018年北京协和医院酵母菌血流感染菌种分布和抗真菌药物敏感性分析[J]. 中国真菌学杂志, 2019,14(6):357-361.
- [11] 林久龙. 医院重症监护室患者中酵母样真菌的分布与药敏结果分析[J]. 医学检验与临床, 2018,29(8):54-56.
- [12] 李妍淳,田彬,岳娜,等. 2014—2020年天津某院真菌血症病原菌分布及耐药性分析[J]. 检验医学, 2021,36(8):800-804.