

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*

周龙荣, 徐元宏 (安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022)

摘要:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是一种可以对多种微生物(包括细菌、酵母和丝状真菌)进行常规鉴定的强有力工具。具有快速、准确、高通量及成本低廉等特点,逐渐被用于丝状真菌感染的实验室诊断中。在丝状真菌的MALDI-TOF MS分析中,从样本制备到获得准确的鉴定结果,每个步骤都决定了医技人员能否及时为临床医生提供准确结果。现就待测样品的制备及MALDI-TOF MS技术对丝状真菌分析(包括鉴定、分型、抗真菌敏感性测试方面)的应用及前景作一系统综述,也将对其一些未来发展进行展望。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS);丝状真菌

中图分类号:R379.2;Q503 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)01-005-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.01.002

Application of Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry(MALDI-TOF MS) in the Laboratory Diagnosis of Filamentous Fungi

ZHOU Long-rong, XU Yuan-hong (Department of Clinical Laboratory,
the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

Abstract: Matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a powerful tool for routine identification of a variety of microorganisms, including bacteria, yeast and filamentous fungi. Fast, accurate, high-throughput and low-cost characteristics, and gradually used for filamentous fungal infection in the laboratory diagnosis. In the MALDI-TOF MS analysis of filamentous fungi, from sample preparation to obtaining accurate identification results, each step determines whether the medical technician can provide accurate results for the clinician. This review will provide a systematic overview of the applications and prospects of filamentous fungal analysis (including identification, typing, and antifungal susceptibility testing) from preparation of the test sample to the MALDI-TOF MS technique, as well as a review of some of its future developments.

Keywords: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS); filamentous fungi

丝状真菌属于多细胞真菌,由菌丝和孢子组成,菌丝伸长分支,交织成团^[1]。传统上,微生物实验室通过形态学(包括直接镜检和培养)、组织病理学、血清学等方法诊断丝状真菌感染,在众多方法中,形态学是目前真菌诊断的基础,但这种方法操作繁琐、培养条件苛刻、检测周期长,且敏感度和阳性率均不理想,非常不利于临床医生及时准确地诊治相关病原体导致的感染^[2]。随着遗传序列分析技术的产生和发展,进一步加快了对丝状真菌的精确鉴定,对于临床实践中难以鉴定,或通过常规表型方法需要长时间才能鉴定的丝状真菌类型,序列分析技术已逐渐成为其精确鉴定的重要手段和鉴

定标准^[3]。然而,序列分析方法虽然准确,但检测周期长且检测费用高,故其应用被局限在相对少数的机构,不能作为丝状真菌的常规检测手段。

近年来,临床微生物实验室通过使用纯生物物理方法,如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS),大大缩短了丝状真菌的鉴定时间,并取得了良好的鉴定效果^[4,5],其在丝状真菌的相关研究中具有重要的临床应用价值。本文将首先对MALDI-TOF MS进行简要介绍,再对MALDI-TOF MS技术在丝状真菌分析过程中的应用,包括样品的制备、鉴定、分型和抗真菌敏感性等进行系统综述;最后将对MALDI-TOF MS技术

* 基金项目:国家基金委自然科学基金项目,项目编号:81171606。

作者简介:周龙荣(1991-),女,硕士,技师,主要从事微生物学研究,Tel:18655270851。

通讯作者:徐元宏,男,教授,主任技师,博士研究生导师,E-mail:xyhong1964@163.com。

在丝状真菌中的应用前景进行展望。

1 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS) 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是近些年来新兴的菌种鉴定技术,可通过直接检测生物标志物(蛋白)来鉴定病毒、细菌、真菌等微生物^[6~9],具有高敏感性、高通量和高检测速度等特点。其基本原理是将待测样品与等量的基质溶液混合或分别点加在样品的靶盘上,溶剂挥发后形成样品与基质的共结晶,利用激光作为能量来源辐射结晶体,基质从激光中吸收能量使样品吸附,基质与样品之间发生电荷转移使得样品分子电离,样品离子在加速电场下获得相同的动能,经高压加速、聚焦后进入飞行时间检测器进行质量分析,将检测到的离子峰为纵坐标,离子质荷比(m/z)为横坐标,形成质量图谱;通过软件分析比较,筛选并确定出特异性指纹图谱,从而实现对目标微生物种或菌株的区分和鉴定^[10]。

2 MALDI-TOF MS 技术对丝状真菌的分析

2.1 待测样品制备 样品制备方法对真菌鉴定的准确度有重大影响。从完整细胞/全细胞 MALDI-TOF MS 分析的最初设计开始,通过从给定微生物的细胞/孢子表面解吸特定肽/蛋白质生物标志物而获得质谱图谱^[10]。为了开发用于丝状真菌 MALDI-TOF MS 鉴定的样品制备方法和样品沉积技术研究者们已经做出了各种努力^[11]。最初这些方法依赖于酸化溶剂来预提取蛋白质^[12]或在 MS 分析之前进行珠粒搅拌步骤^[13,14]。然而,据文献报道,不同研究之间的样本制备方法存在分歧:①完整细胞/全细胞法,即将微生物样本直接点样到平板上,然后将 1 μ l 甲酸(70%~100%)施用于微生物并使其干燥。该步骤有助于提取蛋白质,使得它们可以更容易地用于鉴定。一旦甲酸干燥,加入 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)基质,并按照正常方案进行 MALDI-TOF MS。②细胞裂解法,这种方法包括乙醇-甲酸程序,可达到完全的蛋白质提取,其在将上清液沉积到靶板上之前由短暂的温育和离心步骤组成。在这两种可行的样本制备方法中,前者由于甲酸溶液能够在短时间内实现对目标的萃取,被推荐用于 Saramis Andromas 和 Vitek MS 系统,而后者则更适用于 Bruker MALDI Biotyper^[15]。然而,由于丝状真菌的生物学复杂性,如不同表型的菌丝或分生孢子可以在相同真菌分离株中共存,以及真菌存在坚韧厚实的细胞壁,这些都会导致在使用基本的样品制备方法,例如“完整细胞”或“全细胞”法对真菌进行直接鉴定时产生障碍^[6]。

在鉴定曲霉属、青霉属、镰孢属或其它临床相

关的代表性丝状真菌时^[4,5],可以使用以下样品制备方法:①直接菌落沉积法,包括在没有预先提取或裂解的情况下,点样菌落的一部分;②提取菌落沉积法,包括真菌细胞在用化学法或机械法破碎之后,点样菌落衍生的提取物。

此外,还有研究表示,用于 MALDI-TOF MS 分析的基质在应用之前,通过一个简单而快速的方案,即用一滴菌丝体和/或分生孢子的水混合物直接点在靶板上^[17],便能够为从临床标本培养的丝状真菌分离株提供准确的鉴定。

目前也有研究已经注意到,在真菌生长的早期和晚期阶段之间存在显著的光谱差异^[16,17]。因此,一些研究选择将来自年幼真菌和成熟真菌的光谱合并到其定制的参考数据库中(年幼菌落直径<1 cm,成熟菌落直径约 3 cm)^[16,17]。相比之下,Del Chierico 等^[18]人进行的实验发现,在丝状真菌培养 120 h 后提取菌落进行鉴定可产生最佳质量的光谱。在同一菌株的传代培养之间也已经观察到了光谱的异质性,并且已被提出作为 MALDI-TOF MS 鉴定丝状真菌可能影响重现性的因素^[19]。包括来自相同菌株的不同亚培养物的参考光谱,比增加单一培养物的参考光谱的数量更大程度地改善了鉴定率^[19]。在肉汤培养物中过夜后提取真菌已被建议作为减少光谱异质性的方法,并且由 Bruker Daltonics(Billerica, MA)推荐用于真菌文库,尽管这样的方法增加了分析的周期。

不管使用何种方法,只有当用于分析的提取方法与用于生成数据库光谱的提取方法相同时^[20],才能进行可靠的鉴定。在常规实验室工作中,不管选择哪种方法,都应该考虑使用生物安全柜处理样品,以便使潜在的实验室获得性感染,或污染的孢子形成雾化的风险最小化。在分析之前需要灭活模具,并且已经为此目的探索了几种方法,如可使用乙醇处理、热处理或机械裂解。

2.2 MALDI-TOF MS 分析 待测样本制备好以后即可上机进行检测。待测样本经质谱仪分析后获得特定的质谱图,与数据库中的参考光谱比对就可明确样本菌的种类。

已经证明,使用更新的商业光谱数据库或精心设计的定制数据库对于获得可靠的结果至关重要。目前,尚没有美国食品药品监督管理局(FDA)批准的用于分析丝状真菌的数据库,并且因此已经使用多种方法来处理用于鉴定的微生物。在鉴定过程中,待测样本所产生的数据可以分为:①属或种水平的正确鉴定;②不可靠鉴定(NRI);③属的错误鉴定(主要错误);④没有发现峰(NPF);⑤无生长(NG)。独立于所使用的样品制备方法或数据库,

MALDI-TOF MS 鉴定结果将根据制造商推荐的标准使用对数分数值而自动分类:①正确的属和种鉴定(得分值 ≥ 2.0);②安全的属鉴定(得分值 $1.7 \sim 2.0$);③无可靠鉴定(得分值 < 1.7)。

到目前为止,已经开发了两个大规模的临床数据库用于通过 MALDI-TOF MS 鉴定丝状真菌。通过使用 294 个分离株的参考光谱构建了第一个数据库,其包括 152 种丝状真菌,其中 58 个参照菌株来自于良好生长的菌落,236 个分离株来自于国家卫生研究所(NIH)中的患者样品^[20]。当用来自一组 421 个临床分离株的光谱进行对比分析时,NIH 数据库对于所测试的分离物约 90% (370/421)给出可接受的种水平鉴定(评分 ≥ 2.0),而单独使用 Bruker Biotyper 文库(BDAL v. 3.3.1.0_4110 ~ 4613)只能鉴定其中的三个分离株(0.7%)^[20]。第二个数据库包含了 2 832 个参考光谱,覆盖了 347 种丝状真菌,使用了 708 个分离株构建,每个分离株具有四个光谱^[21]。当用来自 1 107 个临床分离株(主要来自呼吸道标本)的图谱进行对比分析时,该数据库能够对 98.8% (1 094/1 107)的分离株进行种水平鉴定,对应于 107 个物种。重要的是,当使用表型方法,包括 MALDI-TOF MS,对先前鉴定的一组临床分离株进行重新评估时,可以使物种多样性从 16 分类群增加到 42 分类群^[21]。然而,需要注意的是,对于临床丝状真菌分离株的鉴定,当很少见或不常见的真菌物种没有被包含在商业数据库中时,可能会得到较低的鉴定率^[22]。

2.3 MALDI-TOF MS 对丝状真菌的分型 用于鉴定病原微生物并监测其全球传播状况的传统微生物分型技术通常难以标准化,并且缺乏足够的适用性。及时报告菌株的分型信息对于早期启动感染控制措施,以防止病原体进一步传播和流行至关重要。最近研究表明,MALDI-TOF MS 除了可以准确鉴定丝状真菌之外,还具有对丝状真菌进行分型的潜力。对于丝状真菌(主要是曲霉属和青霉属),真正的挑战是开发有效的蛋白质提取方法^[20],这对鉴定结果的可靠性很重要,对分型更重要。目前已经公布了各种样品制备方法^[4],并且已经制定了标准化程序^[23]。

MALDI 分型的局限性之一是缺乏数据解释指南。峰值模式的统计分析在评估分型特异性生物标志物中是至关重要的,基于 MALDI-TOF 的微生物分型的另一个主要局限性,主要在于分析蛋白质谱和峰谱的算法^[24]。增加特定病原体的数据库可增强 MALDI-TOF 用作鉴定和分型菌落的能力,并最终用作临床微生物实验室的流行病学监测

的常规工具。对于微生物亚型分型,MALDI-TOF MS 代表了一种新的有前途的分型方法,替代了脉冲场凝胶电泳和多位点序列分析等传统方法。尽管 MALDI-TOF MS 技术对于微生物鉴定和分型具有很高的精度,但当把适当的参考菌株的更多光谱加入数据库时,其性能可以显著提高。实际上,数据库精制和富集是 MALDI-TOF MS 的基本要素,并且将增加该方法作为物种鉴定和分型的预期工具的能力。我们相信,如果解决这些局限性,MALDI-TOF MS 将在未来取代其他的微生物分型和检测方法。

2.4 抗丝状真菌敏感性测试 抗真菌剂,特别是氟康唑和卡泊芬净的广泛使用,在一定程度上导致了对这些常用抗真菌剂表现出敏感度降低或耐药性的真菌物种和菌株的出现。这加强了对从感染患者中回收的分离株进行抗真菌药敏试验(AFST)的重要性,也加强了可重复的将 AFST 方法检测结果作为抗真菌治疗指南的需要^[25]。两种标准肉汤微量稀释技术,由临床和实验室标准研究所(CLSI)及欧洲抗菌药物敏感性试验委员会(EUCAST)制定,已被接受用于进行丝状真菌的 AFST。作为这些参考技术的替代方法,目前已经开发了基于 MALDI-TOF MS 技术,并用于测试临床相关的曲霉属的抗真菌易感性的测定方法^[26]。

使用一组野生型且棘白菌素耐药性 FKS 的突变体曲霉属(10 株)进行检测,研究发现被测分离株的最小质谱图谱变化浓度(MPCC)值,MPCC 表示在抗真菌药物氟康唑最低浓度下,当与在不同药物稀释度(从 128 $\mu\text{g/ml}$ ~ 0.125 $\mu\text{g/ml}$)孵育 15 h 的丝状真菌获得的光谱中记录的峰图案相比时,其在质谱中诱导出了显著变化。与最小抑制浓度(MIC)或最小有效浓度(MEC)的值一致性达到 100%^[26]。相比之下,应用最近提出的卡泊芬净的临床断点(CBP)值与 CLSI 参考方法产生的分类一致性为 94.1%,烟曲霉和黄曲霉的所有分离株分别显示出 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 的 MPCC 值,重要的是,MPCC 值与 MECs 值一致^[26]。目前形式的质谱法-AFST(ms-AFST)要求实验室用户使用两种 AFST 进行测定(即 ms-AFST 和 CLSI/EUCAST 方法),并且实验室人员在使用软件算法方面需要进行培训。这种新的快速 AFST 方法具有扩展到其他抗真菌剂或耐药性表型进行鉴定的潜力,因为它并不依赖于特定的基因或蛋白进行检测。

3 总结和展望 在不到十年的时间内,MALDI-TOF MS 已成为临床微生物实验室中鉴定微生物的金标准。其在丝状真菌的应用方面具有不可估

量的潜力,除了用于鉴定微生物之外,在加速微生物诊断,单个菌株的分型以及抗丝状真菌耐药性测试等方面已经逐渐成为微生物学家关注的焦点,如近些年真菌耐药机制的研究已经逐渐受到人们的重视,但丝状真菌的耐药性研究还相对较少^[27]。然而,MALDI-TOF MS投入丝状真菌鉴定应用过程中仍然需要努力克服一些障碍,如生物安全问题、数据库急需开发和评估问题、样本处理方法的标准化问题等。我们相信,如果解决这些局限性并进一步优化,MALDI-TOF MS在不久的将来将可以取代其他的鉴定方法。

参考文献:

- [1] 倪语星,尚红.临床微生物学检验[M].5版.北京:人民卫生出版社,2012:288.
Ni YX, Shang H. Clinical microbiology test[M]. 5th. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012: 288.
- [2] 文艳,刘爱胜,张勇,等. ICU危重病患者深部真菌感染血清中降钙素原和(1,3)- β -D葡萄糖联合检测的临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2): 120-122.
Wen Y, Liu AS, Zhang Y, et al. Diagnosis value of joint detection of critical patients procalcitonin and (1,3)- β -D gluca with deep fungal infections ICU[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(2): 120-122.
- [3] Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases [J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 840-862.
- [4] Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(3): 547-603.
- [5] Sanguinetti M, Posteraro B. MALDI-TOF mass spectrometry: any use for *Aspergilli* [J]. Mycopathologia, 2014, 178(5/6): 417-426.
- [6] Posteraro B, De Carolis E, Vella A, et al. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond [J]. Expert Rev Proteomics, 2013, 10(2): 151-164.
- [7] Kliem M, Sauer S. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics [J]. Curr Opin Microbiol, 2012, 15(3): 397-402.
- [8] Murray PR. What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology [J]. J Mol Diagn, 2012, 14(5): 419-423.
- [9] 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.
- [10] Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry [J]. Mass Spectrom Rev, 2001, 20(4): 157-171.
- [11] Chalupová J, Raus M, Sedlářová M, et al. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. J Biotechnol Adv, 2014, 32(1): 230-241.
- [12] Welham KJ, Domin MA, Johnson K, et al. Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14(5): 307-310.
- [13] Hettick JM, Green BJ, Buskirk AD, et al. Discrimination of penicillium isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22(16): 2555-2560.
- [14] Hettick JM, Green BJ, Buskirk AD, et al. Discrimination of aspergillus isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting [J]. Anal Biochem, 2008, 380(2): 276-281.
- [15] Vermeulen E, Verhaegen J, Indevuyst C, et al. Update on the evolving role of MALDI-TOF MS for laboratory diagnosis of fungal infections [J]. Curr Fungal Infect Rep, 2012, 6(3): 206-214.
- [16] Alanio A, Beretti JL, 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.
- [17] De Carolis 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] Del Chierico F, Masotti A, Onori M, et al. MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin [J]. Journal Proteomics, 2012, 75(11): 3314-3330.
- [19] Normand AC, Cassagne C, Ranque S, et al. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi [J]. BMC Microbiol, 2013, 13(1): 76.

(上接 8 页)

- [20] Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, et al. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(3): 828-834.
- [21] Gautier M, Ranque S, Normand AC, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: revolutionising clinical laboratory diagnosis of mould infections[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(12): 1366-1371.
- [22] Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases[J]. Clin Chem, 2015, 61(1): 100-111.
- [23] Cassagne C, Ranque S, Normand AC, et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28425.
- [24] Spinali S, Van Belkum A, Goering RV, et al. Microbial typing by MALDI-TOF MS; do we need guidance for data interpretation? [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(3): 760-765.
- [25] Posteraro B, Torelli R, De Carolis E, et al. Antifungal susceptibility testing: current role from the clinical laboratory perspective[J]. Mediterr Journal Hematol Infect Dis, 2014, 6(1): e2014030.
- [26] De Carolis E, Vella A, Florio AR, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus species* [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(7): 2479-2483.
- [27] 侯欣, 张丽, 徐英春, 等. 念珠菌耐药机制研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(1): 60-64.
Hou X, Zhang L, Xu YC, et al. Research review on antifungal drug resistance mechanisms in *Candida* SPP[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(1): 60-64.

收稿日期: 2016-10-28

修回日期: 2016-11-29