

MALDI-TOF MS 技术在真菌鉴定中的应用

李 振 钱增堃 刘福荣 徐成泉 应 斐

[关键词] 质谱;真菌;鉴定;蛋白质;指纹

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2022.04.025

近年来,随着广谱抗菌药物的广泛应用,艾滋病、肿瘤和接受免疫抑制药物治疗的患者逐年增多,以及导管技术和器官移植手术的大量开展,真菌感染已成为危及患者生命的主要因素之一。真菌属于条件致病菌,多在机体免疫功能低下时引发内源性感染^[1]。侵袭性念珠菌对住院患者的致死率最高,白假丝酵母菌则成为最重要的致病真菌,而各种罕见真菌及耐药性真菌的致病病例也多有报道并呈现逐渐增高的趋势^[2-3]。如何早期、准确、快速地诊断真菌感染是临床治疗的关键。真菌感染临床症状多不典型、易被基础疾病掩盖,而真菌培养、鉴定和药物敏感性试验通常需要3~4 d,对临床的早期诊断和治疗造成困难,也使得真菌感染的病死率逐渐升高。常规念珠菌显色平板法、曲霉菌形态学鉴定方法以及生化鉴定系统的鉴定能力已难以满足临床需求。以核糖体内转录间区测序技术为代表的分子生物学方法是近些年发展起来的新技术,其诊断准确度高,可以作为真菌鉴定的金标准^[4],但其操作程序复杂繁琐且对实验室条件及操作人员的技术水平要求较高,难以常规开展。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)是近年快速发展起来的一种新型软电离物质谱技术。MALDI-TOF MS是基于蛋白质组学水平进行鉴定,具有鉴定能力强、分辨率高、用时短、易操作和成本低的特点。MALDI-TOF MS由基质辅助激光解吸电离离子源(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)和飞行时间质量分析器(time-of-flight mass analyzer, TOF) 2大模块组合而成。MALDI的原理是先使用基质液使蛋白质形成共结晶,再利用激光照射使得生物结晶体解离,最后产生不同的离子;TOF的工作原理是离子在电场作用下加速飞过飞行管道,不同质荷比(M/Z)的离子到达检测器的时间不同,据此获得特异的细菌蛋白质谱指纹峰图,将该峰图与标准数据库图谱进行比对,进行结果的判读。该技术自2009年开始用于真菌的鉴定,目前已取得较大发展,本文就MALDI-TOF MS在临床真菌鉴定方面的应用进行综述。

1 MALDI-TOF MS 在临床常见酵母菌鉴定中的应用

以白假丝酵母菌为代表的酵母菌已成为侵袭性真菌感染的首要病原菌群,传统的鉴定方法包括念珠菌显色平板法和Microscan、Vitek、API20C等基于生化反应的全自动微生物鉴定仪系统,这些检测方法均需较长周期和较高成本,并且难以鉴定不显色、不常见或生化反应相近的真菌^[5-6]。MALDI-TOF MS作为新兴的检测技术已经在酵母菌的鉴定中发挥了重要的作用。陈蓉等^[7]对原卫生部临床检验中心发放的质控菌株进行多系统比较,发现MALDI-TOF MS对8例酵母样真菌全部直接鉴定到种,鉴定准确率均为100.00%,与Vitek 2 Compact鉴定结果一致,且都高于MicroScan WalkAway 96 plus的鉴定准确率(87.50%)。梁铮等^[5]对135株酵母样真菌的正确鉴定率也是高达98.50%。质谱法在种的鉴定方面也有较好地鉴定效果。张丽等^[8]使用Bruker MS和VITEK MS2种质谱系统对305株近平滑念珠菌进行种间的鉴定,证明二者对近平滑念珠菌的鉴定结果均较好,分别为98.40%和97.70%。但由于数据库系统没有参考图谱或者亲缘关系太近等原因,两系统对似乎滑念珠菌和拟平滑念珠菌或无法鉴定或准确率不高。研究^[9]显示,解脂念珠菌、异常汉逊酵母菌、产阮念珠菌、葡萄牙念珠菌等少见念珠菌的检测符合率较低,甚至无法鉴定。主要由数据库不完整、某些真菌图谱缺乏特征性的峰值、真菌菌落干燥、胞壁较厚导致核蛋白无法完全释放等原因导致。

2 MALDI-TOF MS 技术鉴定丝状真菌的结果评价及影响因素分析

相较于传统的形态学鉴定方法,质谱技术具有快速、准确、人为因素少等优势,已成为鉴定常见丝状真菌的重要方法和发展趋势。在侵袭性曲霉菌的鉴定方面,不同的培养基和培养时间对形态学方法鉴定结果影响较大, MALDI-TOF MS则不受上述因素的干扰,且结果均优于形态学方法^[10]。贺靖冬等^[11]对139株丝状真菌的鉴定结果显示,曲霉属的鉴定正确率达

89.20%, 其中对最常见的烟曲霉和黄曲霉的鉴定正确率达 100%。但由于使用的是早期的 V2.0 数据库等原因对黑曲霉和其他曲霉菌的鉴定正确率较低;对青霉属的鉴定正确率仅有 50.00%, 有 35.70% 不能鉴定, 14.30% 鉴定错误;对毛霉属及其他少见丝状真菌尚不能鉴定。2017 年 6 月, VITEK MS V3.0 版本数据库发布, 并在中国取得注册证, 该版本数据库主要增加了丝状真菌数据库并改变了数据采集方式, 新方式改善了大分子蛋白检测的敏感性 & 提取液标本涂靶板质谱图的获取质量。研究^[12]显示, 使用 VITEK MS V3.0 对 109 株曲霉属进行鉴定, 对曲霉属的属水平鉴定率为 93.62%, 种水平鉴定率为 91.49%, 并且根据鉴定置信度进行统计, 88.30% 的菌株获得了 99.00% 以上的鉴定率, 鉴定率在 86.00% ~ 98.00% 的占 2.13%, 仅有 1.06% 的菌株鉴定率在 75.00% ~ 85.00%。

3 MALDI-TOF MS 鉴定临床罕见真菌的结果评价

由于临床罕见真菌感染的检出率低, 使用质谱鉴定的数量少, 大多数数据库对罕见真菌的收录有限, 这也降低了质谱的鉴定准确率。及时更新和补充数据库或者使用自建数据库是临床迫切的需求。希木龙念珠菌复合体是引起人类感染的少见念珠菌种, 且该菌对两性霉素 B 和唑类高度耐药而导致患者预后不佳。使用常规方法对 40 株希木龙念珠菌菌种鉴定正确率为 47.50%, 而 VITEK MS 则 100.00% 鉴定正确; 5 株假希木龙念珠菌使用常规方法和 VITEK MS 均无法鉴定, 但使用自建数据库的 Bruker MS 系统 5 例均正确鉴定^[13]。隐球菌是中枢神经系统严重的致病菌, 隐球菌感染造成的颅内高压致使患者死亡的比例高达 45.83%^[14]。如何准确快速地鉴别隐球菌一直是临床面临的难题。张博筠等^[15]研究发现, MALDI-TOF MS 无法鉴定格特隐球菌, 可能是因为它是一种新型隐球菌的变种, 数据库中无匹配信息。而平常假丝酵母菌、链状假丝酵母菌和中间假丝酵母菌的鉴定准确率也低于 API ID 32C, 同样的情况在丝状真菌的鉴定方面更加常见。薛氏曲霉、马尔尼菲蓝状菌、以及青霉属、毛霉属等使用 MALDI-TOF MS 技术均无法取得满意的鉴定结果^[11, 16]。即使使用 VITEK MS V3.0 版本数据库进行鉴定, 镰刀菌属和新月弯孢霉的正确鉴定率也只有 50.00% 和 46.20%^[17]。以上研究表明 MALDI-TOF MS 技术在罕见真菌的鉴定能力方面有待提升。

4 MALDI-TOF MS 直接鉴定无菌体液中真菌的研究进展

MALDI-TOF MS 直接鉴定无菌体液中的微生物一直是学者研究的热点之一。直接鉴定细菌可以缩短鉴定周期、减少抗生素的使用、明显改善临床治疗效果, 国内外对于该类试验的研究已取得较好的鉴定效果^[18-19]。但直接鉴定真菌的准确性并不高, 且目前的研究多集中在血培养方面, 而尿液、脑脊液等体液的研究较少。Huang 等^[20]收集了总计 666 例血培养阳性标本进行直接鉴定, 结果显示念珠菌 20.00% 的正确鉴定率远低于革兰阳性需氧菌的 81.60% 和革兰阴性需氧菌的 93.30%。针对酵母菌的相似实验研究^[21]显示, 正确鉴定率同样只有

20.00%。无菌体液鉴定前需要进行特殊的处理, 处理介质和方法的选择直接影响鉴定的结果。周春妹等^[22]通过利用十二烷基硫酸钠作为洗涤液改良前处理方法提高了包括酵母菌在内的细菌检出率, 使用十二烷基硫酸钠处理的 286 例血培养阳性标本, 革兰阳性细菌的正确鉴定率从 65.70% 提高至 90.50%, 酵母菌的正确鉴定率从 11.10% 提高至 50.00%。

5 MALDI-TOF MS 鉴定真菌面临的主要问题

无论何种质谱检测系统, 其鉴定的准确率都依赖于数量充足和图谱信息精确的指纹图谱数据库。为了完善和更新指纹图谱数据库, 广大学者和研究机构都在积极探索。Vidal-Acuña 等^[23]先对数据库进行了扩展, 然后使用 200 株曲霉菌进行验证, 95.50% 的结果正确鉴定到菌种水平, 4.50% 鉴定到菌属水平。Triest 等^[24]使用自建数据库进行试验, 菌种鉴定率达到 91.00%。李颖等^[25]研究显示, 不同培养基和不同的培养时间对丝状真菌的鉴定结果无影响, 数据库中是否存在对应参考图谱是影响鉴定结果的关键因素。

实验前的准备阶段是影响丝状真菌鉴定结果的主要因素之一, 不同的菌体蛋白提取方案直接影响鉴定的准确性^[26]。由于丝状真菌的菌丝和孢子的细胞壁厚度不一致, 导致蛋白质析出的效率不一致, 故取材部位是影响鉴定结果的重要因素, 研究^[27]表明菌丝的鉴定结果优于孢子。如何快速充分的提取细菌蛋白, 其中最主要的是破壁阶段。丝状真菌的细胞壁厚度达 100 ~ 200 nm, 需使用特殊的细胞裂解方法, 如甲酸乙腈法、磁珠破碎法、旋转培养法等。另外, 适宜的基质溶剂系统关系到蛋白质的提取效率, 亦是质谱鉴定结果的关键因素。Park 等^[28]使用甲酸乙腈提取蛋白的方法对 345 株曲霉菌进行鉴定, 菌种的正确鉴定率达到了 94.50% (326/345), 菌属正确鉴定率达到了 98.80% (341/345), 是目前推崇的提取方法。现阶段质谱技术鉴定丝状真菌仍存在成本高、过程复杂、成功率低、易污染环境、蛋白提取困难等不足之处, 菌株库也有待完善, 但其较高的准确率和快速鉴定的优势仍越来越受到青睐^[29-30]。

基于 MALDI-TOF MS 技术检测真菌结果准确、重复性好、操作简便快速、成本低的优点, 其临床应用越来越广泛, 有逐渐取代传统方法之势。但目前尚缺乏统一的操作规范和完善的指纹图谱数据库, 严谨的质量管理体系也急需建立。随着研究的不断深入和经验的积累, MALDI-TOF MS 技术在真菌鉴定领域一定会发挥越来越重要的作用。

参考文献

- [1] 许淑君, 马雪娇, 李家斌. 肝硬化失代偿期患者并发真菌感染危险因素分析[J]. 安徽医学, 2018, 39(6): 643-646.
- [2] 田涸. 2015 ~ 2017 年某医院念珠菌感染及其耐药性分析[J]. 中国真菌学杂志, 2019, 14(1): 37-41.
- [3] XIAO M, SUN Z Y, KANG M, et al. Five-year national surveillance of invasive candidiasis: species distribution and azole susceptibility from the China Hospital Invasive Fungal

- Surveillance Net(CHIF – NET) study[J]. J Clin Microbiol, 2018,56(7):e00577 – 18.
- [4] KATHURIA S, SINGH P K, SHARMA C, et al. Multidrug – resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix – assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method[J]. J Clin Microbiol, 2015,53(6):1823 – 1830.
- [5] 梁铮, 柏彩英, 罗娅莎, 等. MALDI – TOF – MS 技术快速鉴定临床酵母样真菌的应用评价[J]. 检验医学与临床, 2015,12(18):2659 – 2660,2663.
- [6] 黄声雷, 胡必杰, 陈蓉, 等. 两种 MALDI – TOF MS 系统快速鉴定血培养中白念珠菌以外酵母样真菌[J]. 检验医学, 2015,30(2):128 – 131.
- [7] 陈蓉, 居颢, 刘战民. 3 种鉴定系统在微生物室间质量评价中的应用和比较[J]. 检验医学, 2017,32(5):415 – 420.
- [8] 张丽, 王贺, 肖盟, 等. Bruker MS 与 VITEK – MS 鉴定近平滑念珠菌复合体的性能对比[J]. 中华医院感染学杂志, 2016,26(10):2219 – 2222.
- [9] 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.
- [10] 沈松坤, 陈涌泉. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术在临床感染性曲霉菌快速鉴定中的应用[J]. 国际医药卫生导报, 2018,24(6):918 – 920.
- [11] 贺靖冬, 侯敏, 李庆, 等. MALDI – TOF MS 在呼吸道感染丝状真菌鉴定中的应用[J]. 检验医学与临床, 2016,13(z2):14 – 16.
- [12] 叶雨艳, 王强, 沈跃云, 等. MALDI – TOF MS 在临床曲霉菌鉴定中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2018,41(8):577 – 582.
- [13] 侯欣, 王贺, 肖盟, 等. Vitek MS 与 Bruker MS 对希木龙念珠菌复合体鉴定能力评估[J]. 国际检验医学杂志, 2018,39(24):3023 – 3026.
- [14] 张兴波, 李家斌. 隐球菌性脑膜炎 24 例临床特点分析[J]. 安徽医学, 2019,40(9):1032 – 1034.
- [15] 张博筠, 叶乃芳, 王中新. MALDI – TOF MS 鉴定酵母菌应用评价[J]. 安徽医科大学学报, 2017,52(4):501 – 504.
- [16] 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.
- [17] 张伟铮, 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.
- [18] BHAVSAR S M, DINGLE T C, HAMULA C L. The impact of blood culture identification by MALDI – TOF MS on the antimicrobial management of pediatric patients[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018,92(3):220 – 225.
- [19] 方盼盼, 杨俊梅, 杨俊文, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术在直接鉴定血流感染病原菌中的应用[J]. 中国临床新医学, 2019,12(5):518 – 522.
- [20] HUANG Y, SUN Q, LI J, et al. Evaluation of an in – house MALDI – TOF MS rapid diagnostic method for direct identification of micro – organisms from blood cultures[J]. J Med Microbiol, 2018,68(1):41 – 47.
- [21] 钱扬会, 李艳君, 丁毅伟, 等. 应用 MALDI – TOF – MS 联合分离胶法快速鉴定阳性血培养标本的初步研究[J]. 检验医学与临床, 2019,16(9):1196 – 1199.
- [22] 周春妹, 沈佳瑾, 黄声雷, 等. 评估 SDS 在 MALDI – TOFMS 直接鉴定阳性血培养样本中的应用价值[J]. 检验医学, 2018,33(3):228 – 232.
- [23] VIDAL – ACUÑA M R, RUIZ – PÉREZ DE PIPAÓN M, TORRES – SÁNCHEZ M J, et al. Identification of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption ionization time – of – flight mass spectrometry (MALDI – TOF MS)[J]. Med Mycol, 2018,56(7):838 – 846.
- [24] TRIEST D, STUBBE D, DE CREMER K, et al. Use of matrix – assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry for identification of molds of the *Fusarium* genus[J]. J Med Microbiol, 2015,53(2):465 – 476.
- [25] 李颖, 李冬雪, 郭莉娜, 等. Vitek MS 在丝状真菌临床分离株鉴定中的应用评估[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2018,38(7):500 – 504.
- [26] AZRAD M, FREIDUS V, KASSEM R, et al. Identification of dermatophytes by MALDI – TOF MS technology in the clinical laboratory[J]. Int J Mass Spectrom, 2019,440:32 – 36.
- [27] LI Y, WANG H, ZHAO Y P, et al. Evaluation of the bruker biotyper matrix – assisted laser desorption/ionization time – of – flight mass spectrometry system for identification of *aspergillus* species directly from growth on solid agar media[J]. Front Microbiol, 2017,8:1209.
- [28] PARK J H, SHIN J H, CHOI M J, et al. Evaluation of matrix – assisted laser desorption/ionization time – of – flight mass spectrometry for identification of 345 clinical isolates of *Aspergillus* species from 11 Korean hospitals; comparison with molecular identification[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2017,87(1):28 – 31.
- [29] 吴友伟, 石红, 刘万静, 等. MALDI – TOF – MS 技术快速鉴定丝状真菌的临床评价[J]. 检验医学与临床, 2017,14(21):3155 – 3156,3159.
- [30] 张景, 姜斌, 彭娜, 等. MALDI – TOF MS 对临床侵袭性丝状真菌的快速鉴定技术的研究[J]. 中国真菌学杂志, 2021,4:247 – 251.