

• 综 述 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2023. 14. 027

MALDI-TOF MS 技术在真菌鉴定和药敏试验中的影响因素研究

李家政, 缪杨阳 综述, 郭 勇[△] 审校

南京中医药大学附属苏州市中医医院检验科, 江苏苏州 215000

摘 要:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是一种具有经济、快速、准确、高通量等特点的新技术,广泛应用于临床微生物的常规鉴定。近年来,随着 MALDI-TOF MS 技术的不断发展,其在临床感染性真菌的快速鉴定、药敏试验、分型等实验室诊断中在一定程度上弥补了传统形态学鉴定的不足,展现出巨大的应用潜力。由于真菌种类繁多、结构复杂、耐药谱多样及表型可变,在 MALDI-TOF MS 技术分析真菌的过程中,影响因素相对来说比较复杂,该文就不同培养条件、蛋白质提取方法和蛋白图谱数据库等条件对 MALDI-TOF MS 技术鉴定真菌的影响作一综述。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术; 真菌鉴定; 真菌药敏试验; 真菌分型
中图分类号:R978.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2023)14-2104-04

Influencing factors of MALDI-TOF MS technology in fungal identification and drug susceptibility test research

LI Jiazheng, MIAO Yangyang, GUO Yong[△]

Department of Clinical Laboratory, Suzhou Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou, Jiangsu 215000, China

Abstract: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a new technique with economical, rapid, accurate and high-throughput characteristics, which is widely used in the routine identification of clinical microorganisms. In recent years, with the continuous development of MALDI-TOF MS technology, it has made up for the shortcomings of traditional morphological identification to a certain extent in the laboratory diagnosis of clinical infectious fungi, such as rapid identification, drug sensitivity test and typing, and has shown great application potential. Due to the wide variety, complex structure, diverse drug resistance spectrum and variable phenotype of fungi, the influencing factors are relatively complex in the process of fungi analysis by MALDI-TOF MS. This article reviews the influencing factors of fungi identification by MALDI-TOF MS under different culture conditions, protein extraction methods and protein map databases.

Key words: matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; identification of fungi; fungal susceptibility testing; classification of fungi

近年来,由于恶性肿瘤的高发病率及化疗药物、广谱抗菌药物和免疫抑制剂等在临床的广泛应用,侵袭性真菌感染的发生率和病死率呈明显上升趋势^[1]。真菌感染的临床表现复杂,顽固难治愈,易误诊误治,早期抗真菌治疗对患者生存至关重要。抗真菌治疗不充分、延迟开始治疗时间均会增加患者的病死率^[2]。传统的真菌鉴定方式,尤其是丝状真菌的鉴定,主要依赖形态学方法。由于检验人员专业水平和经验参差不齐,其准确性和时效性较差,鉴定困难和鉴定错误的情况时有发生,进而导致治疗失败、病情延误。虽然分子测序技术是真菌鉴定的“金标准”,但

其操作复杂、价格昂贵且对实验条件和人员要求较高,难以在临床实验室常规开展。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是一种跨学科的检测新技术,具有适应范围广、快速、准确、高通量、经济、操作方便等优势^[3]。近几十年来,科研人员对 MALDI-TOF MS 技术在临床真菌的快速鉴定、药敏试验等方面不断探索和实践,在一定程度上弥补了传统形态学和分子测序技术上的不足。影响质谱鉴定真菌的因素比较复杂,尤其是丝状真菌,在培养条件、蛋白质提取方法、蛋白图谱数据库均不同的条件下,鉴定结果具有较大差异,仍需进行改进和完善^[4]。本

[△] 通信作者, E-mail: guoyong32@126. com。

文基于近几年来 MALDI-TOF MS 技术在临床真菌鉴定和诊断中的应用进展,总结出不同检测条件对鉴定结果的影响,旨在为临床实验室实施 MALDI-TOF MS 技术鉴定真菌提供相应信息。

1 培养条件对 MALDI-TOF MS 技术鉴定真菌的影响

丝状真菌受生长条件和真菌菌丝体区域的影响,呈现出可变的表型。菌龄、培养基种类、培养条件等均可能会导致蛋白质谱差异,干扰样品的正确鉴定。有研究显示,来源相同的尖孢镰刀菌株,在两种不同琼脂培养基平板温度为 25 ℃ 的环境下生长 1 周,蛋白质谱具有明显差异,随着时间的推移,即使在含有相同培养基的琼脂平板上,也会对蛋白质谱产生影响,特别是蛋白质峰的相对高度^[5]。丝状真菌的孢子和菌丝体具有不同的生物相和蛋白质图谱,在采集固体培养基上的丝状真菌样品时,二者往往被同时采集,进而影响鉴定结果。布鲁克系统建议用液体培养基培养丝状真菌,因为液体培养基中丝状真菌分离物主要是菌丝体,可以提高蛋白质谱质量。但由于液体培养基存在雾化孢子污染风险和无法可视化宏观和微观表型特征的缺点,临床实验室仍然以直接从固体培养基中收集真菌样品为主,以简化样品制备过程并节省时间。

对于酵母菌,使用不同的培养基同样会对 MALDI-TOF MS 技术的鉴定对数评分值有明显影响^[6]。一般而言,采用 MALDI-TOF MS 技术分析的菌落,应选择已经经过所用检测系统制造商验证的培养基,以提高鉴定结果与数据库的匹配度,保证鉴定质量。总之,用户应了解制造商推荐的培养基优、缺点及其孵育条件,以提高 MALDI-TOF MS 技术鉴定真菌的性能。

2 标本制备对 MALDI-TOF MS 技术鉴定真菌的影响

对 MALDI-TOF MS 技术来说,标本制备及合适的蛋白质提取方法是影响鉴定灵敏度、分辨率和再现性的关键步骤。标本制备不当会导致较低的峰分辨率,影响鉴定结果。基于 MALDI-TOF MS 技术的丝状真菌鉴定在过去几年受到限制,主要原因是缺乏高效的样品制备方法来保证高质量的蛋白质谱。与细菌不同,真菌可以通过简单的预处理方法快速准确地获得鉴定结果,而真菌的传统预处理方法,特别是丝状真菌则更为复杂,涉及乙醇、甲酸、乙腈等试剂和离心等提取过程,不同丝状真菌蛋白质提取方法对质谱鉴定结果的影响差异较大。

HONSIG 等^[7]根据 MALDI-TOF MS 技术制造商提供的 3 种不同标本制备方法,比较各自在鉴定丝

状真菌物种水平的识别率,结果显示,液体培养有效识别率最高(76.1%),优于细胞裂解法(62.0%)和完整细胞法(48.9%)。除制造商推荐的样本制备方法外,在临床工作中,广大科研人员也不断探索和开发出了许多新的样本制备方法。PENG 等^[8]描述了一种更方便、省时、省试剂、灵敏的预处理方法:甲酸夹层法。使用安图生物质谱仪的 Autof MS 系统时,甲酸夹层法能够实现 93.9% 的物种级鉴定;当临床库、科研库、内部数据库结合使用时,使用梅里埃公司的 VITEK MS 系统能实现 97.3% 的物种级鉴定。NING 等^[9]创建了两种快速提取丝状真菌蛋白质的方法:氧化锆-二氧化硅磁珠法(ZSB)和聚焦超声法(FUS),并使用 VITEK MS 系统评估了两种方法的识别精度。按制造商推荐的常规蛋白质提取方法,VITEK MS 系统物种级正确鉴定率为 76.42%,ZSB 和 FUS 物种级正确鉴定率分别为 79.67% 和 76.42%。按制造商推荐的常规蛋白质提取程序,每个丝状真菌预处理时间至少需要 30 min,而 ZSB 和 FUS 分别将每份标本的操作时间减少至 7 min 或 5 min,每个额外的菌株只需多出几秒,从而节省了大量时间。

通常,实验技术人员采用的预处理方法和策略基于他们的经验或实验室标准操作规程,但这种模式可能会导致反复鉴定,给日常工作带来负担,造成时间、人员、耗材等成本的浪费。因此,实验人员需开拓思维,根据情况选择适当的分析前预处理方法,提高 MALDI-TOF MS 技术的鉴定效率和准确率。

3 数据库对 MALDI-TOF MS 技术鉴定真菌的影响

微生物数据库是 MALDI-TOF MS 技术鉴定的关键组成部分,菌株识别的准确率主要依靠菌株数据库的功能,尤其是新物种的鉴定对其依赖性更强。目前,在临床实验室主要的数据库有布鲁克公司的 Biotyper 系统、梅里埃公司的 VITEK MS 系统和安图生物公司的 Autof MS 系统等。现有的数据库均不够完善,临床真菌的鉴定准确率在不同系统之间存在一定差异。

有研究对各数据库中存在的菌株进行了评价,对于丝状真菌,Biotyper 系统进行种、属或复合物的鉴定准确率为 76.7%,高于 VITEK MS 系统的 50.0%;对于酵母菌,Biotyper 系统的鉴定准确率为 82.9%,低于 VITEK MS 系统的 93.3%。对于数据库中不存在的真菌,VITEK MS 系统比 Biotyper 系统给出了更多的错误识别^[10]。还有相似的研究也显示,Biotyper 系统对酵母菌株物种水平的鉴定率稍逊于 VITEK MS 系统^[11]。最近有研究评估了 3 种不同的 MALDI-TOF MS 系统在鉴定临床丝状真菌方面

的表现, VITEK MS 系统最具有优势, 96.0% 菌株鉴定到物种水平, 98.4% 到属水平; Biotyper 系统 42.1% 菌株鉴定到物种水平, 42.9% 到属水平; Autof MS 系统 58.7% 菌株鉴定到物种水平, 60.3% 到属水平^[12]。在鉴定不同物种复合物内的酵母分离物方面, Autof MS 系统比 VITEK MS 系统具有更高的鉴定准确性, 在系统密切相关的物种复合物中鉴定不太常见的物种方面, VITEK MS 系统的鉴定能力仍有待提高^[13]。性能识别方面, Autof MS 系统与 Biotyper 系统相当, 但 Autof MS 系统在数据库中提供了更多的真菌物种级结果, 测试时间大约是 Biotyper 系统的一半^[14], 在临床微生物实验室中, 能够提供更高的通量。

在数据库的构建过程中, 其覆盖范围、类型等至关重要。目前有很多机构致力于构建内部参考数据库, 以提高 MALDI-TOF MS 技术对罕见的、新兴的或地方性真菌的识别率。MALDI-TOF MS 技术自建库的构建需用数据库中没有的真菌分离株或物种不断扩展和更新, 并用其他数据库或者方法相互验证。目前由于各实验室相对独立, 不同自建库不能够共享, 因此, 开发可在线获取的参考频谱数据库十分必要。在线获取的参考频谱数据库的开发, 能促进不同实验室间进行相互验证和补充, 达到资源优化和共享, 提高 MALDI-TOF MS 技术的诊断效率和拓宽应用范围。

4 MALDI-TOF MS 技术在检测抗真菌药敏试验 (AFST) 方面的应用

现阶段, 根据美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 和欧洲抗菌药物敏感试验委员会的指南, AFST 的参考方法为肉汤稀释法, 但这种方法需要较长的时间, 会延误患者及时抗真菌治疗的时间。

基于 MALDI-TOF MS 技术, 对 AFST 进行了两种相对较新的尝试, 第一种是基于暴露在不同浓度抗真菌药物时真菌图谱的变化, 根据得到的复合相关指数 (CCI) 作出推断^[15]。第二种是基于 MALDI Biotyper 系统快速测定抗菌药物敏感性试验 (MBT ASTRA), 针对不同浓度的抗真菌剂确定感染因子的生长状况, 并与提供相对生长比 (RG) 的无药物对照组比较, 通过定义临界值且根据相应抗真菌浓度的 RG, 将病原体的生长量分类为易感或耐药^[16]。

基于 MALDI-TOF MS 技术的 AFST, 目前没有广泛应用于临床真菌性疾病的诊断, 各实验室仍处于探索研究阶段, 一些研究通过 CCI 获得了很高的诊断值, 但这些结果具有一定差异^[17-18]。VATANSH-ENASSAN 等^[16]通过采用 MBT ASTRA 和 CLSI 指南推荐的肉汤稀释法, 比较分析了对卡泊芬净耐药的白色念珠菌和光滑念珠菌的检测数据, 验证了 MBT

ASTRA 方法, 结果显示, 与肉汤稀释法比较, 白色念珠菌 MBT ASTRA 检测的灵敏度和特异度均为 100.0%; 光滑念珠菌 MBT ASTRA 检测的灵敏度、特异度和有效性分别为 94.0%、80.0% 和 95.0%^[16]。KNOLL 等^[19]通过 Meta 分析, 系统评价了基于 MALDI-TOF MS 技术检测酵母菌和丝状真菌对唑类和棘白菌素类抗真菌药物的耐药性, 与肉汤稀释法比较, 基于 MALDI-TOF MS 技术的耐药性检测具有 91.1% 的灵敏度和 95.1% 的特异度。MBT ASTRA 方法的总体灵敏度达到 96.0%, 优于 CCI 的 85.3%, 两种方法的特异度相似, 分别为 93.2% 和 94.2%^[19]。

AFST 模式在物种之间可能有较大差异, 因此, 快速、可靠地鉴定真菌耐药性对患者管理及改善预后至关重要^[20]。AFST 常用方法的周转时间为 24~48 h, MBT ASTRA 周转时间在 8 h 以内^[19]。因此, 基于 MALDI-TOF MS 技术的 AFST, 有望成为临床实验室快速准确检测真菌耐药性的一种方法。

5 展 望

尽管 MALDI-TOF MS 技术在临床真菌诊断领域存在一定局限, 但在过去几年中, MALDI-TOF MS 技术具有的易用性、低耗时、低成本及高通量等特点改变了临床实践, 为临床实验室诊断真菌感染做出了贡献。由于新病原体的出现及不断变化的微生物分类学的推动, 未来的研究需进一步改进和扩展真菌参考数据库, 优化培养和提取蛋白质的标准化操作程序, 加强 MALDI-TOF MS 技术在真菌药敏试验、真菌菌株分型等方面的应用, 实时探索临床真菌物种的演变多样性。总之, MALDI-TOF MS 技术的发展为真菌病的临床和治疗管理提供了新方向, 为个性化医疗提供了巨大潜力。

参考文献

- [1] GONZALEZ-VICENT M, RAMOS-AMADOR J T. Fungal infection in immunocompromised children [J]. Rev Iberoam Micol, 2021, 38(2): 75-83.
- [2] SAVAGE R D, FOWLER R A, RISHU A H, et al. The effect of inadequate initial empiric antimicrobial treatment on mortality in critically ill patients with bloodstream infections: a multi-centre retrospective cohort study [J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0154944.
- [3] HOU T Y, CHIANG-NI C, TENG S H. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology [J]. J Food Drug Anal, 2019, 27(2): 404-414.
- [4] 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]. 中国微生物学杂志, 2022, 34(3): 289-294.
- [5] REEVE M A, BACHMANN D. A method for filamen-

tous fungal growth and sample preparation aimed at more consistent MALDI-TOF MS spectra despite variations in growth rates and/or incubation times[J]. Biol Methods Protoc, 2019, 4(1):bpz003.

[6] WANG H, LI Y, FAN X, et al. Evaluation of bruker biotyper and vitek MS for the identification of candida tropicalis on different solid culture media[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2019, 52(4):604-611.

[7] HONSIG C, SELITSCH B, HOLLENSTEIN M, et al. Identification of filamentous fungi by MALDI-TOF mass spectrometry: evaluation of three different sample preparation methods and validation of an in-house species cutoff[J]. J Fungi, 2022, 8(4):383.

[8] PENG D, ZHU X, LIU Y, et al. Evaluation of formic acid sandwich (FA-sandwich): a pretreatment method for filamentous fungi, for the identification of clinically relevant filamentous fungi by two MALDI-TOF MS systems[J]. Med Mycol, 2022, 60(4):myac018.

[9] NING Y T, YANG W H, ZHANG W, et al. Developing two rapid protein extraction methods using focused-ultrasonication and zirconia-silica beads for filamentous fungi identification by MALDI-TOF MS[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:687240.

[10] LEVESQUE S, DUFRESNE P J, SOUALHINE H, et al. A side by side comparison of bruker biotyper and VITEK MS; utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory[J]. PLoS One, 2015, 10(12):e0144878.

[11] PORTE L, GARCIA P, BRAUN S, et al. Head-to-head comparison of Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry in chile[J]. PLoS One, 2017, 12(5):e0177929.

[12] SUN Y, GUO J, CHEN R, et al. Multicenter evaluation of three different MALDI-TOF MS systems for identification of clinically relevant filamentous fungi[J]. Med Mycol, 2021, 59(1):81-86.

[13] YI Q, XIAO M, FAN X, et al. Evaluation of Autof MS 1000 and Vitek MS MALDI-TOF MS system in identification of closely-related yeasts causing invasive fungal diseases [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:628828.

[14] PARK J H, JANG Y, YOON I, et al. Comparison of Autotf ms1000 and bruker biotyper MALDI-TOF MS platforms for routine identification of clinical microorganisms [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021:6667623.

[15] PAUL S, SINGH P, AS S, et al. Rapid detection of fluconazole resistance in candida tropicalis by MALDI-TOF MS[J]. Med Mycol, 2018, 56(2):234-241.

[16] VATANSHENASSAN M, BOEKHOUT T, LASS-FLÖRL C, et al. Proof of concept for MBT ASTRA, a rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based method to detect caspofungin resistance in candida albicans and candida glabrata[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(9):e00420-18.

[17] ROBERTO A E, XAVIER D E, VIDAL E E, et al. Rapid detection of echinocandins resistance by MALDI-TOF MS in Candida parapsilosis complex[J]. Microorganisms, 2020, 8(1):109.

[18] VELLA A, DE CAROLIS E, MELLO E, et al. Potential use of MALDI-ToF mass spectrometry for rapid detection of antifungal resistance in the human pathogen candida glabrata[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):9099.

[19] KNOLL M A, ULMER H, LASS-FLÖRL C. Rapid antifungal susceptibility testing of yeasts and molds by MALDI-TOF MS; a systematic review and Meta-analysis [J]. J Fungi, 2021, 7(1):63.

[20] KIDD S E, CRAWFORD L C, HALLIDAY C L. Antifungal susceptibility testing and identification[J]. Infect Dis Clin North Am, 2021, 35(2):313-339.

(收稿日期:2022-11-15 修回日期:2023-02-18)

(上接第 2095 页)

[11] 陆芳, 彭梅, 王丽华. 超声 GI-RADS 分类结合血清 HE4 与 CA125 检测对卵巢单房囊实性肿瘤的诊断价值[J]. 重庆医学, 2019, 48(1):149-151.

[12] 李文凯. 超声 GI-RADS 分类法对卵巢良恶性肿瘤的诊断价值[J]. 实用癌症杂志, 2018, 33(5):756-759.

[13] 谢艳秋, 任敏, 王大维, 等. 超声改良妇科影像学报告和数据库系统(mGI-RADS)分级诊断卵巢肿瘤的临床应用价值[J]. 中华超声影像学杂志, 2020, 29(5):421-426.

[14] 赵艳娜, 周伟, 傅一萍, 等. 超声甲状腺影像报告与数据库系统及超声积分法对甲状腺结节的诊断价值[J]. 中国超声医学杂志, 2018, 34(5):14-17.

[15] LEE E J, CHANG Y W. Combination of quantitative parameters of shear wave elastography and superb microvascular imaging to evaluate breast masses[J]. Korean J Radiol, 2020, 21(9):1045-1054.

[16] ZHONG L, WANG C. Diagnostic accuracy of ultrasound superb microvascular imaging for breast tumor: a meta-analysis[J]. Med Ultrason, 2020, 22(3):313-318.

[17] 肖露, 褚雯, 王华. 超微血管成像技术对乳腺肿瘤血管形态分布特征及其诊断效能的初步分析[J]. 中华超声影像学杂志, 2018, 27(11):973-976.

(收稿日期:2022-11-22 修回日期:2023-04-15)