

Pathol Transl Med, 2016, 50(4): 294-299.

[26] Flores-Miramontes MG, Torres-Reyes LA, Alvarado-Ruiz L, et al. Human papillomavirus genotyping by Linear Array and Next-Generation Sequencing in cervical samples from Western Mexico[J]. Virol J, 2015, 12(1): 161.

[27] Barzon L, Lavezzo E, Costanzi G, et al. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology[J]. J Clin Virol, 2013, 58(2): 346-350.

[28] Castle PE, Eaton B, Reid J, et al. Comparison of human papillomavirus detection by Aptima HPV and Cobas HPV tests in a population of women referred for colposcopy following detection of atypical squamous cells of undetermined significance by Pap cytology[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(4): 1277-1281.

[29] Felix C, Lacey J, Miller D, et al. The clinical and economic benefits of Co-Testing versus primary HPV testing for cervical cancer screening: a modeling analysis [J]. J Womens Health (Larchmt), 2016, 25(6): 606-616.

[30] Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American cancer society, American society for colposcopy and cervical pathology, and American society for clinical pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer[J]. J Low Genit Tract Dis, 2012, 16(3): 175-204.

[31] World Health Organization. Guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention[M/OL]. Geneva, Switzerland: WHO, 2013[2016-08-15]. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/94830/1/9789241548694_eng.pdf.

[32] Poland A, Whitaker A, Poland M, et al. Vaccinology in the third millennium: scientific and social challenges[J]. Curr Opin Virol, 2016, 17(1): 116-125.

[33] Poland GA, Kennedy RB, Ovsyannikova IG. Vaccinomics and personalized vaccinology: is science leading us toward a new path of directed vaccine development and discovery [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(12): e1002344.

[34] 刘昱, 祁文娟, 魏丽惠. HPV 预防性疫苗在预防子宫颈癌中的应用进展[J]. 中国妇产科临床杂志, 2013, 14(4): 378-381.

(收稿日期: 2016-10-18 修回日期: 2016-12-20)

• 综 述 •

MALDI-TOF-MS 鉴定丝状真菌研究进展*

武 静 综述, 胡成进, 刘晓斐, 公衍文[△] 审校

(济南军区总医院实验诊断科, 济南 250031)

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 丝状真菌; 快速鉴定

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 05. 034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)05-0664-03

近年来,丝状真菌感染的发病率和病死率逐渐增高,研究表明抗真菌治疗延迟与病死率升高密切相关,因此,快速、准确鉴定至种水平越来越必要^[1]。目前形态学鉴定是丝状真菌鉴定最广泛的方法。该方法鉴定率低,鉴定时间长,需 4~5 d 时间,易延误临床的诊断和治疗;由于菌株表型特征多变,易受到实验室人员个人经验的影响;裂褶菌、尖端赛多孢子菌组织形态学与曲霉属、镰刀菌非常相似,仅靠组织形态学很难区别开^[2]。用真菌通用引物 Its1 和 Its4 进行聚合酶链反应扩增结合 DNA 测序对丝状真菌进行鉴定,是目前公认的金标准,但操作繁琐,前处理需 1 h,鉴定需 24~48 h,对操作人员要求高,易受到污染导致失败;米曲霉与黄曲霉,阿姆斯特丹散囊菌与冠突散囊菌等基因序列高度同源,用该方法很难区分^[3]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)为一种快速、准确鉴定细菌和酵母菌的方法,并广泛应用于临床,而对丝状真菌的鉴定还处于科研阶段。

1 质谱鉴定丝状真菌概述

MALDI-TOF-MS 是近年发展起来的一种新型软电离质谱技术,通过检测未知微生物的蛋白质指纹图谱并与质谱图数

据库中特征性谱图进行比对,从而对待测微生物进行快速鉴定^[4]。近年来, MALDI-TOF-MS 广泛应用于临床微生物的快速鉴定,尤其在细菌鉴定方面被证实为一种准确、快速、经济的方法,随着该技术的不断发展和完善,其在临床真菌快速鉴定研究中的作用也日益显著。

Ling 等^[5]对 33 篇 MALDI-TOF-MS 鉴定真菌的文献共涉及 9 977 株真菌做了 Meta 分析,分析证实利用 MALDI-TOF-MS 鉴定丝状真菌虽没有像鉴定酵母菌那样取得满意的成果,相比其他方法鉴定率仍然较高。有文献统计质谱仪对临床常见丝状真菌鉴定效果均较好,包括曲霉属、青霉属、镰刀菌属、木霉属、皮肤癣菌、毛霉目真菌等,特别是临床常见的曲霉属^[6]。质谱仪单菌株鉴定仅需 20 min,可同时检测多种菌株,是目前用时较短操作也较简便的方法。因此, MALDI-TOF-MS 将会成为丝状真菌诊断领域不可或缺的工具。然而与细菌不同,质谱数据库中丝状真菌数量有限且细胞壁难以破裂需要特殊的前处理,此外图谱易受到不同阶段的产物如孢子、子实体、表面菌丝和基内菌丝体等的影响^[7]。因此,为促进 MALDI-TOF-MS 鉴定丝状真菌在临床实验室的推广实施,仍

* 基金项目:全军医学科技“十二五”重点项目(BWS12J014)。

[△] 通信作者, E-mail: 18660179631@126.com。

需要进一步的探索研究。

2 临床常见丝状真菌的 MALDI-TOF-MS 鉴定情况

2.1 曲霉属 分布最广泛的丝状真菌,可作为机会致病菌感染人类,如烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉。曲霉可侵犯机体许多部位,尤其是呼吸系统,全身性曲霉病有增高的趋势^[8]。Cas-sagne 等^[9]一直致力于真菌的标准化操作程序的研究。采用甲酸和乙腈来进行提取,以 α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)作为基质进行采图,并建立质谱库。随后用 200 株菌进行验证,87%被准确鉴定到种。Alanio 等^[10]建立的数据库,包含 23 种不常见霉菌。Lau 等^[11]采用的前处理方法为,首先将氧化锆/二氧化硅珠溶于无水乙醇,从培养基上取菌落置于其中,漩涡震荡,离心使样本乳化,再加 70%甲酸和乙腈重复离心,上清液直接测量或冷冻。研究者分析了 294 株分离株(包含 58 株参考菌株)和 236 株临床菌株,涉及 76 个属 152 个种,曲霉数量最多,同时建立了质谱库。随后用 421 株菌进行验证,鉴定率在 90%。

黄曲霉和米曲霉是既独立又紧密联系的物种,二者基因序列相似度达 99.5%,所以,分子生物学方法能够鉴定到黄曲霉/米曲霉群,但不能区分出黄曲霉与米曲霉^[12]。然而黄曲霉能产生有毒的黄曲霉毒素,米曲霉则广泛用于食品发酵和工业酶制剂生产。有研究者利用 MALDI-TOF-MS 分析了黄曲霉、米曲霉的孢子,显示产毒菌株与非产毒菌株有不同的质谱峰,从而利用质谱可以将米曲霉株与产毒的黄曲霉株区分开来^[13]。然而黄曲霉在代谢中产生不同的代谢产物,有一些无毒性被认为与米曲霉更接近,但是非产毒的黄曲霉与米曲霉的质谱峰非常相似,仍有进一步研究显示利用质谱的聚类分析则很容易将其分辨出^[14]。

2.2 青霉属 青霉属广泛分布于土壤、空气、谷物等,可生产抗生素、有机酸、酶制剂,在生物技术和医疗方面发挥重要作用,马内非青霉可引起马内非青霉病。研究者利用 MALDI-TOF-MS 以 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)为基质,区分桔青霉、意大利青霉、指状青霉,这些菌的特征峰质荷比(m/z)为(2 500~7 500) $\times 10^3$ ^[15]。该实验组用该方法再次从腐烂的水果中成功鉴定出桔青霉和绿霉。另一研究分析了 12 种青霉,将菌置于乙腈/4%甲酸体积比为 1:1 溶液中,进行磁珠挤压 1 min,循环 3 次,将提取物与 HCCA 基质混合后加到靶板上,经过处理后的样本比未处理的样本产生了更多高质量的峰,特征峰出现在 m/z 为(5 000~20 000) $\times 10^3$, m/z 为 13 900 的峰存在于所有菌的谱图中,被认为是生物标志峰^[16]。判别分析和聚类分析都证实了该方法重复性较高。

2.3 镰刀菌属 广泛分布在土壤中,可侵染多种植物。大部分无害,但也有一些可产生毒素。当成熟的谷物被这些镰刀菌感染后,镰刀菌毒素通过食物链最终到达人或动物^[17]。串珠镰刀菌毒素可致癌。可引起肺部感染、心内膜炎、脑脓肿和真菌血症,其发病率和病死率仅次于白色假丝酵母菌和曲霉感染。

De Carolis 等^[18]利用来自微生物实验室的 55 种 103 株菌构建质谱库,研究显示由于菌落孵育时间长短会影响谱峰特征,因此孵育时间长和孵育时间短的菌落均被纳入质谱库。验证结果显示质谱能将 96.8%的镰刀菌正确鉴定至种水平。

利用 MALDI-TOF-MS 检测色镰刀菌存在很大的挑战,因为颜料的存在会阻碍与基质的结晶及随后蛋白峰的采集。研究者针对禾谷镰刀菌对其孢子提取前的洗涤步骤进行了研究。

溶剂有水、乙腈、甲醇、乙醇、异丙醇、有机酸和 N-辛基葡萄糖苷(单用或混合)^[19]。在溶剂中加入 1 种酸如甲酸或三氟乙酸会与基质产生共结晶,从而获得高质量的谱峰。用乙腈/0.5%甲酸(体积比为 7:3)洗涤后用双层体积法制备样本,取得了最好的效果。

2.4 木霉属 木霉属为子囊菌门。Neuhof 等^[20]利用 MALDI-TOF-MS 分析木霉菌属和肉座菌属。每个靶孔加约 10^6 个细胞,以 DHB 作基质,差异峰 m/z 为(5 000~10 000) $\times 10^3$,为疏水蛋白峰,核糖体蛋白(MALDI 分析细菌最常用蛋白)并未鉴定出。疏水蛋白为菌丝和孢子细胞壁的外膜蛋白,菌丝有无孢子、翻译后 N 端和 C 端处理程序不同都会影响疏水蛋白。

2.5 皮肤癣菌 浅部真菌,主要侵犯患者的皮肤、毛发和指甲,包括毛癣菌属、表皮癣菌属、小孢子菌属、子囊菌属。研究显示,用甲酸乙腈法提取后以 HCCA 为基质采图或直接准移到靶板上以 DHB 为基质采图,菌株可在 m/z (2 000~20 000) $\times 10^3$ 产生 60~120 个信号峰,获得的结果与内部转录间隔区(ITS)和 5.8S rDNA 测序结果一致,明显优于传统形态学鉴定^[21-22]。

2.6 毛霉目真菌 毛霉属、根霉属、横梗霉属是引起毛霉病的菌,对常用抗真菌药耐药,所以在抗真菌治疗前需要准确、快速诊断。Schroedl 等^[23]对 53 株真菌进行研究,46 株为横梗霉属。用甲酸乙腈法提取后以 HCCA 为基质采图。建立数据库,肽蛋白谱峰 m/z 在(2 000~20 000) $\times 10^3$,46 株横梗霉均被正确鉴定。以质谱数据构建的系统进化树与多基因序列构建的系统进化树吻合。

3 真菌药敏试验

抗真菌药物的广泛应用加速了耐药菌株的出现,从而真菌药敏试验在指导真菌治疗方面变得越来越重要。之前研究显示,白色念珠菌暴露于氟康唑会导致蛋白表达发生变化随之带来质谱峰的变化^[24];暴露于一系列浓度的卡泊芬净 15 h 后,蛋白改变同样带来质谱峰的变化。De Carolis 等^[25]研究了一种利用 MALDI-TOF-MS 计算复合相关指数来检测念珠菌和曲霉菌对棘白菌素-卡泊芬净耐药性的方法。该方法用终点读数替代了经典的 MIC 值,虽然比参考方法只是轻微节省了时间,然而 MALDI-TOF-MS 可以消除参考方法的主观性,更好地区分拖尾生长的菌株与真正耐药的菌株^[26]。

4 总结与展望

在真菌学领域,MALDI-TOF-MS 相比传统的形态学和生化试验,在分辨力、准确性、时效性方面均有优势,因此,MALDI-TOF-MS 将会成为丝状真菌诊断领域不可或缺的工具。然而 MALDI-TOF-MS 随之带来的几个问题,例如某些菌株的固有特性会导致谱峰质量差,质谱数据库还需进一步完善,尤其是对于一些不常见的菌种。研究者认为进一步规范标准化操作程序,简化前处理操作步骤,扩展商业数据库,均能够改善真菌鉴定现况,尤其是扩展商业数据库,能够提高 MALDI-TOF MS 对真菌的鉴定能力。

目前,利用 MALDI-TOF-MS 进行菌株分型和真菌药敏试验的研究数据还较少。随着对流行病学追踪和抗真菌药物耐药性的探索,这些领域必将会得到更广泛的研究。也有一些领域尚未涉足,如毒力因子的研究、与抗真菌耐药性和生物膜形成真菌感染有关的蛋白的研究、具有生物活性的代谢产物的研究。因此,为改善真菌的感染诊断和治疗,还需进一步的研究

探索。

参考文献

- [1] Moore EC, Padiglione AA, Wasiak J, et al. Candida in burns: risk factors and outcomes[J]. J Burn Care Res, 2010, 31(2): 257-263.
- [2] 尹秀云, 梁钰英, 于农, 等. 临床少见丝状真菌的实验室诊断[J]. 军事医学, 2015, 39(11): 855-858.
- [3] 郭鹏豪, 刘秀丽, 崔颖鹏, 等. 真菌通用引物 Its1 和 Its4 在丝状真菌鉴定中的价值评价[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(8): 922-924.
- [4] 陈世敏. MALDI-TOF MS 在感染性疾病诊断中的应用[J]. 医学综述, 2015, 21(22): 4127-4130.
- [5] Ling HZ, Yuan ZJ, Shen JL, et al. Accuracy of Matrix-Assisted laser desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry for identification of clinical pathogenic fungi: a Meta-Analysis[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(7): 2573-2582.
- [6] Ranque S, Normand AC, Cassagne C, et al. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory[J]. Mycoses, 2014, 57(3): 135-140.
- [7] McMullen AR, Wallace MA, Pincus DH, et al. Evaluation of the VITEK MS MALDI-TOF MS system for identification of clinically relevant filamentous fungi[J]. J Clin Microbiol, 2016, 25(1): 816-825.
- [8] Gugnani HC. Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli[J]. Front Biosci, 2003, 8(1): 346-357.
- [9] Cassagne C, Ranque S, Normand A, 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): 28425.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Gibbons JG, Salichos L, Slot JC, et al. The evolutionary imprint of domestication on genome variation and function of the filamentous fungus Aspergillus oryzae[J]. Curr Biol, 2012, 22(15): 1403-1409.
- [13] Li TY, Liu BH, Yc C, et al. Characterization of aspergillus spores by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14(24): 2393-2400.
- [14] Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology[J]. Proteomics, 2013, 13(5): 788-799.
- [15] Chen HY, Yc C. Characterization of intact Penicillium spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19(23): 3564-3568.
- [16] 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.
- [17] Bennett JW, Klich M. Mycotoxins[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(3): 497-516.
- [18] 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.
- [19] Dong HJ, Kemptner J, Marchetti-Deschmann MA, et al. Development of a MALDI two-layer volume sample preparation technique for analysis of colored conidia spores of Fusarium by MALDI linear TOF mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 395(5): 1373-1383.
- [20] Neuhoef T, Dieckmann R, Druzhinina IS, et al. Direct identification of hydrophobins and their processing in Trichoderma using intact-cell MALDI-TOF MS[J]. FEBS J, 2007, 274(3): 841-852.
- [21] Packeu A, Hendrickx M, Beguin H, et al. Identification of the trichophyton mentagrophytes complex species using MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Med Mycol, 2013, 51(6): 580-585.
- [22] Nenoff P, Erhard M, Simon JC, et al. MALDI-TOF mass spectrometry-a rapid method for the identification of dermatophyte species[J]. Med Mycol, 2013, 51(1): 17-24.
- [23] Schroedl W, Heydel T, Schwartze VU, et al. Direct analysis and identification of pathogenic lichtheimia species by Matrix-Assisted laser desorption Ionization-Time of flight Analyzer-Mediated mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 419-427.
- [24] Marinach C, Alanio A, Palous M, et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of Candida albicans and fluconazole[J]. Proteomics, 2009, 9(20): 4627-4631.
- [25] 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.
- [26] Posterard B, De Carolis E, Vella AA. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond[J]. Expert Rev Proteomics, 2013, 10(2): 151-164.