

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在微生物鉴定中的研究进展

尹盼盼^{1,2}, 白雯静³, 李海燕^{1,2}, 彭腾腾^{1,2}, 石晓峰^{*1,2,3}

1 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2 甘肃省医学科学研究所, 甘肃 兰州 730000

3 兰州市食品药品检验检测研究院, 甘肃 兰州 730000

尹盼盼, 白雯静, 李海燕, 彭腾腾, 石晓峰. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在微生物鉴定中的研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4655-4666.

YIN Panpan, BAI Wenjing, LI Haiyan, PENG Tengting, SHI Xiaofeng. Research progress of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in microbial identification[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4655-4666.

摘要: 与传统的微生物鉴定技术相比, 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)是一种准确、可靠和快速的鉴定和分型的技术。本文通过检索近年来国内外相关研究论文, 总结最新的研究进展, 发现MALDI-TOF MS在临床病原微生物、食源性微生物以及环境微生物等鉴定中有较大的优势, 加快了微生物鉴定的进程, 同时探索该技术在新领域的最新进展和面临的挑战, 以期为我国基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术的发展提供参考。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 微生物; 鉴定

资助项目: 2022年度甘肃省陇原青年创新创业人才项目; 2021年甘肃省科技重大项目(21ZD4FA013); 兰州市科技计划项目(2020-XG-21)

This work was supported by the Gansu Longyuan Youth Innovation and Entrepreneurship Talent Project in 2022, the Gansu Province Science and Technology Major Projects in 2021 (21ZD4FA013), and the Lanzhou Science and Technology Project (2020-XG-21).

*Corresponding author. E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

Received: 2023-02-20; Accepted: 2023-04-08; Published online: 2023-06-01

Research progress of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in microbial identification

YIN Panpan^{1,2}, BAI Wenjing³, LI Haiyan^{1,2}, PENG Tengting^{1,2}, SHI Xiaofeng^{*1,2,3}

1 College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu, China

2 Gansu Provincial Academic Institute for Medical Research, Lanzhou 730000, Gansu, China

3 Lanzhou Institute of Food and Drug Inspection and Testing, Lanzhou 730000, Gansu, China

Abstract: Compared with traditional techniques for microbial identification, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is an accurate, reliable, and rapid technology for identification and typing. We reviewed the relevant research papers in recent years and summarized the latest research progress. MALDI-TOF MS has great advantages in the identification of clinical pathogenic microorganisms, foodborne microorganisms, and environmental microorganisms, which accelerates the process of microbial identification. Furthermore, we explored the latest progress and challenges of this technology in new fields, aiming to provide reference for the development of MALDI-TOF MS in China.

Keywords: matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS); microorganisms; identification

随着先进诊断技术的出现和病原体流行病学的发展,致病病原体种类的数量迅速增加。病原体感染主要发生在免疫力低下和具有高发病率和高死亡率的个体中。不准确的微生物分类以及食品、药品中微生物检测不合格会导致临床医生的误诊和用药不准确,因此,对微生物进行准确的鉴定和分型不仅是微生物学研究的任务,而且对保护人类自身的健康非常重要,对于预防人类疾病很有意义^[1]。

传统的微生物鉴定为表型鉴定,主要依据微生物的形态学特征(大小、形状及排列方式等)、生态学特征(营养、代谢产物及酶活性等)、生理生化特征(温度、水分及 pH 等)、对噬菌体的敏感性(用已知专一噬菌体对未知相应细菌进行种的鉴定)和血清学反应(抗原抗体反应)等,虽然传统方法在国内实验室被普遍使用,但是仅适用于一类菌种的鉴定,并且需要极强的专业技术^[2-3];

基于分子水平的基因分型虽然比传统方法的分辨率高、重复性好,但成本较高且耗时较长,传统方法和基因分型已难以满足微生物快速准确的鉴定和分型需求^[4],表 1 总结了传统微生物鉴定、16S rRNA 基因序列分析法和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)这 3 种方法的优缺点, MALDI-TOF MS 因其分析迅速、操作简单和高准确度被临床实验室认可和接受,而且现有的商业数据库也可以进行常规检测^[5]。20 世纪 90 年代末 MALDI-TOF MS 的出现给微生物鉴定带来高效准确及低成本的方法^[6],对微生物鉴定来说是一种增补而非取代^[7],并且也在流行病学的研究、水和食源性病原体的检测、抗生素耐药性的检测、血液和尿液病原体的检测^[8]以及药学中发挥着重要的作用^[9]。MALDI-TOF MS 的工

作原理主要为“基质与样品共结晶→样品解吸附→样品电离→电离的样品因到达检测器的飞行时间不同而被检测”, MALDI-TOF MS 指纹图谱技术不仅能将微生物鉴定到种或者亚种的水平, 而且能将部分的细菌、真菌及病毒可以很好地分型^[10]。本课题组将 MALDI-TOF MS 运用于中药材, 如三七、党参、甘草和黄芪中污染性微生物的鉴定分型, 在大批量样本鉴别时, MALDI-TOF MS 体现出耗时短、效率高等优点^[11-12]。鉴定出污染菌后, 一方面可以为预防药材被污染菌污染提供风险预警; 另一方面为药材微生态问题研究提供理论依据。本文总结国内外 MALDI-TOF MS 技术鉴定临床病原微生物、食源性微生物以及环境微生物等发展研究, 并探索该技术在新领域的最新进展和面临的挑战, 以期为我国基质辅

助激光解吸电离飞行时间质谱技术的发展提供参考。

1 MALDI-TOF MS 的研究概况

在分析生物大分子的研究方法中, 现代质谱脱颖而出。质谱法直接分析各种生物分子如蛋白质、脂质、碳水化合物等, 对整个生物系统进一步加深了认识, 使得质谱技术成为生命奥秘的“最佳搭档”, 在生命科学领域被广泛应用^[13]。由于微生物本身具有独特的蛋白质、多肽, 可以检测蛋白质、多肽的指纹图谱, 所以 MALDI-TOF MS 非常适合微生物生物大分子的测定, 通过采集软电离后微生物菌体的蛋白质、多肽等组分的加氢离子特异性指纹图谱^[14], 参考数据库中标准质谱进行比较分析后可快速得出鉴定结果^[15]。

表 1 三种微生物鉴定技术的优缺点

Table 1 The advantages and disadvantages of three microbial identification techniques

方法 Method	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
MALDI-TOF MS 技术 MALDI-TOF MS technology	操作简单, 分析速度快; 低成本; 高特异性、高通量、高灵敏度、高准确度; 可以检测到微量的化合物, 适用范围广, 可以分析多种化合物 The operation is simple and the analysis speed is fast. Low cost; high specificity, high throughput, high sensitivity and high accuracy; it can detect a small amount of compounds, a wide range of applications, can analyze a variety of compounds	现有数据库相对不够完善; 由于一些菌株具有复杂的壁结构, 样本在基质提取过程中提取率可能低, 会对检测结果造成影响 The existing database is relatively imperfect; due to the complex wall structure of some strains, the extraction rate of samples in the matrix extraction process may be low, which will affect the detection results
传统微生物鉴定 Traditional microbial identification	普遍应用于实验室中, 主要依据菌种的表型特征 It is widely used in the laboratory, mainly based on the phenotypic characteristics of strains	操作复杂, 耗时较长, 仅适用于一类菌种的鉴定, 需要极强的专业技术 The operation is complex and takes a long time. It is only suitable for the identification of a kind of bacteria and requires strong professional technology
16S rRNA 基因序列分 析法 16S rRNA gene sequence analysis	重复性强, 适合鉴定表型异常、描述不详或很少分离的菌株 It has strong repeatability and is suitable for identifying strains with abnormal phenotype, unknown description or few isolates	成本高耗时较长, 难以区分基因密切相关的物种; 鉴定过程容易被污染, 会有假阳性结果 High cost and time-consuming, it is difficult to distinguish species closely related to genes; identification process is easy to be contaminated, there will be false positive results

MALDI-TOF MS 仪器由三部分组成：分别为基质辅助激光解吸电离离子源(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)、飞行时间质量分析器(time-of-flight, TOF)和离子检测器。MALDI 的原理是样品经激光照射后与基质形成的共结晶薄膜, 基质从激光中吸收能量传递给样品使其发生解吸, 然后经过电离过程而发生电荷转移使生物分子电离; TOF 的原理是不同质量的离子从离子源到达检测器所需的时间与其质量有关, 即测定离子的质荷比(m/z)与离子的飞行时间成正比, 根据 m/z 比和信号强度得到指纹图谱^[16-17]。离子检测器有两种: 线性模式和反射模式, 线性模式在早期 MALDI-TOF 中采用, 较重的离子到达检测器的时间晚于较轻的离子, 理论上, 所有离子都获得相同的动能, 相同 m/z 的离子应该同一时间到达检测器, 但是实际中由于相同 m/z 的离子可能接收到的激光辐射强度不同, 因而到达的离子探测器时可能出现的误差, 导致线性模式的分辨率较低; 而反射模式修正了线性模式分辨率的不足, 由离子反射镜、电场组成, 探测器安装在飞行路径的出发端, 离子反射镜将离子反射回来, 迫使它们飞回探测器, 从而提高了分辨率^[18]。工作流程见图 1 (离子检测器为线

性模式)。每个微生物的核糖体蛋白序列和大小各不相同, 不同种的微生物具有不同的蛋白质图谱, 电离出 m/z 比在 2 000 和 20 000 之间的肽或蛋白质^[19], 得到的质谱图与数据库中的标准图谱进行对比得到最接近的菌种进行分值鉴定, 以此来鉴定微生物的种类。

MALDI-TOF MS 在微生物物种鉴定的成本、速度和准确性方面超越了常规诊断方法, 使得 MALDI-TOF MS 技术在众多方法中脱颖而出, 被应用于实验室中, 并且因其迅速、可靠和特异性的物种识别能力以及其可简化抗菌敏感性测试的潜力推进了临床诊断进程^[20]。然而 MALDI-TOF MS 存在的局限性使其分型技术仅在部分菌种上可得到很好的效果。

2 微生物的鉴定

2.1 MALDI-TOF MS 对临床病原微生物的鉴定

近年来越来越多的病原体被检测出, 尤其是在接受过移植或恶性肿瘤治疗的患者中。病原性病菌因具有潜在威胁生命的致病性而备受关注, 在临床上快速鉴定病原体及其表型特征对患者的病情来说尤为重要。单个菌株的分型及抗

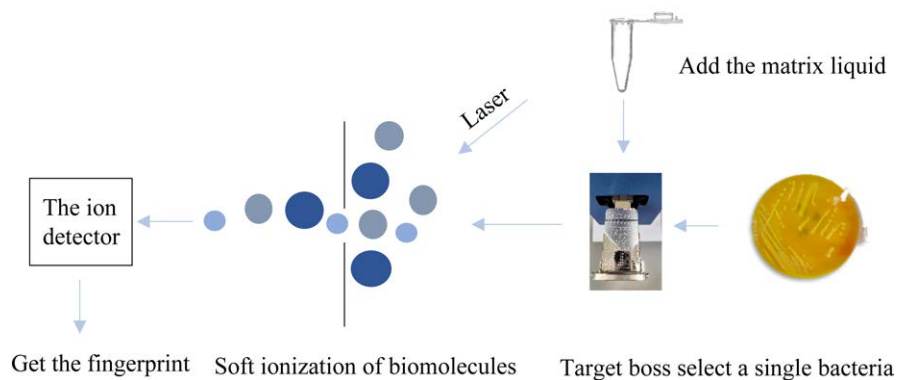


图 1 MALDI-TOF MS 工作流程(线性模式检测器)

Figure 1 MALDI-TOF MS workflow (linear mode detector).

生素和抗真菌耐药性检测已成为人们关注的焦点, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)发展成为常见临床微生物鉴定的标准, 并且加快了微生物鉴定的进程^[21]。在临床上, 分枝杆菌是最重要的细菌属, 结核分枝杆菌复合体导致人类结核病, 传统上鉴定分枝杆菌生化表型缺乏准确性, 而分子方法耗时成本高, MALDI-TOF MS 克服了表型和分子技术的缺点^[22]。以往研究报道分枝杆菌的鉴定准确率为 62%–80%, Wilen 等^[23]用 MALDI-TOF 质谱鉴定 157 株分枝杆菌, 其中 89.2%在种水平上鉴定正确, 分枝杆菌被准确鉴定是治疗结核病的关键一步。大肠杆菌是导致尿路感染的主要病原体, 目前对尿路感染所采取治疗抗生素的要求极高, 达到较高的治愈率就要快速准确地鉴定病原体, 这样有助于及时提供抗生素治疗并减少不必要的抗生素使用^[24]。研究表明 MALDI-TOF MS 从尿液样本中直接鉴定病原体的准确度是 85%的综合灵敏性和 93%的综合特异性, 优于其他常规方法, 证实该方法对于从尿液样品中直接检测病原微生物是可靠的^[25]。ST37 型艰难梭菌是一种革兰阳性厌氧芽孢杆菌, ST37 型艰难梭菌是亚洲地区最主要的流行型并且其对抗生素的耐药性极高, 利用 MALDI-TOF MS 成功鉴定艰难梭菌 RT017 (ST37), 对艰难梭菌相关性腹泻的防治具有重要意义^[26]。

Ling 等^[27]评估了 MALDI-TOF MS 在鉴定临床病原真菌方面的准确性, 分析纳入 444 篇文章, 涉及 38 个试验和 9 977 个真菌分离株, MALDI-TOF MS 的随机效应合并识别的准确度在物种水平上从 95.5%增加到 97.7%, 并在物种水平上对几种类别进行了亚组分析, 结果得出 MALDI-TOF MS 方法对临床致病性真菌的鉴定具有很高的准确性。有人研究了 Bruker MALDI Biotyper 系统, 总共测试了 2 263 种需氧革兰氏

阴性细菌分离株的 23 个属 61 种, 并与 DNA 测序、生化测试进行比较, 正确地将 99.8%识别为属, 并将 98.2%识别为物种水平^[28]。

MALDI-TOF MS 也可鉴定临床罕见或难以鉴定的细菌, 使用 16S rRNA 基因序列分析作为经典“金方法”, MALDI-TOF MS 和 Vitek2 Compact 鉴定总共 180 个临床分离株, MALDI-TOF MS 方法以高达 84.4%的准确度成功鉴定出分离株, 花费的时间每株约为 10 min, 可以成为一种快速、准确地识别临床罕见或难以识别细菌的强有力工具^[29]。在临床研究中, MALDI-TOF MS 可以直接检测来自医院的一些未经纯培养样品, 与传统微生物鉴定相比具有明显的优势, 在急性疾病、特殊病原微生物导致的传染病检测方面也有良好的发展前景, 能够为病原微生物感染的患者争取宝贵时间, 为造福人类健康作出贡献。

2.2 MALDI-TOF MS 对食源性微生物的鉴定

随着时代的发展, 食品行业日益繁荣, 各类型食品层出不穷, 在加工和运输过程中污染风险相应增加。近些年经常会发生一些食源性致病微生物引发的食物中毒或死亡事件, 食物腐败污染既造成了经济损失, 还威胁到人类身体健康, 极易引起社会恐慌。因此需要快速准确鉴定出食源性微生物的表型及基因, 并且明确微生物污染的来源及传播途径, 从而为预防治疗提供重要的信息资料和科学依据^[30]。

酵母作为发酵剂来发酵各种食品和饮料产品(如面包、牛奶、啤酒以及肉制品的发酵), 但是一些菌种如假丝酵母、酿酒酵母以及毕赤氏酵母等会污染食品^[31], 并且一些酵母过度发酵或者过期后也会导致食物变质, 从而滋生细菌, 摄入此类酵母发酵的食物会引起肠道不适, 导致腹痛、腹泻等症状^[32]。为了最大程度地减少食品

业的经济损失和消费者健康的潜在风险,及时采取有效的措施依赖于快速准确地识别有害酵母和变质酵母。传统的表型分类和鉴定不仅需要花费大量时间和金钱,还需要一定的专业人员,而且还可能存在对不常见物种的误认。因此, Pavlovic 等^[33]采用 MALDI-TOF MS 和常规方法至少鉴定了包含 444 种食源性酵母分离株,2 种方法将 62 个分离株准确鉴定到物种水平,常规方法检测时有 15 株分离株被错误鉴定,而 MALDI-TOF MS 未发现错误检测,并且数据库更新明显提高了识别效果。虽然 MALDI-TOF MS 可以区分大多数物种,但是对于某些物种复合体如 *Kazachstania tellulis* 和 *Mrakia frigida* 复合体, MALDI-TOF MS 显示出有限的分辨率,虽然识别同系物种有时会出现问题,但是依旧适用于食源性酵母的常规识别和验证^[34]。研究使用 MALDI-TOF MS 和主成分分析(principal component analysis, PCA)建立了一种用于鉴定食源性致病菌全细胞的方法,该方法不使用蛋白质提取或昂贵的蛋白质数据库,结果表现出较好的峰形和重现性, MALDI-TOF MS 与 PCA 联用可以快速鉴别食品中病原体,但是需要数据库的不断更新^[35]。

变质食品不仅会给人类健康造成威胁,还会造成巨大的经济损失。因此,提前排除食品中不需要的食源性微生物,对其进行快速准确的检测和鉴定会帮助食品工业减少不必要的损失。目前,食品相关微生物种类的鉴定相当具有挑战性,因为只有一定数量的食品相关参考菌,所以数据库的更新和扩大成为快速准确鉴别物种的前提。

2.3 MALDI-TOF MS 对环境微生物的鉴定

自然界中分布的微生物数量极其庞大、种类最为繁多,它们在整个生态系统中发挥着重要的作用。然而目前仍有许多未知且未被鉴定的天然

微生物种群,自然微生物群落的高度复杂性,对于进一步研究这些微生物的表型和基因来说具有非常大的挑战性。随着新技术如生物标记和 MALDI-TOF MS 等的发展,众多新的微生物物种被鉴定,并且在新技术的引领下,研究人员对环境微生物的认知不断改善和拓展,既可以监测病原菌的传播,也可以追踪细菌污染的来源,有望解决环境污染及能源危机等问题。微生物在自然环境中必不可少,它们维持生态系统的平衡,在不同的系统中起到不一样的作用,一方面,它既是生产者合成有机物提供养分,又是消费者将有机物分解成无机物,还是分解者完成生物降解;另一方面,一些微生物(如病原菌)可能对人类有害,可能导致感染和疾病,甚至危及生命。因此细菌在环境和生态系统中的作用不可忽视,分离和鉴定环境微生物对环境研究乃至人类的需求至关重要,从而促进环境研究的快速发展并节省时间和成本^[36]。

水体中存在许多微生物,大部分对水生动物无害,但有一小部分有害,例如软体水产养殖中弧菌是主要病原体。DNA 扩增和测序可以准确识别弧菌物种,但是既昂贵又费时。Moussa 等^[37]创建了软体动物疾病的弧菌物种的 120 个主要光谱 newEnviBase 数据库,使用 MALDI-TOF MS 方法进行常规检测,足以识别正确的亚种。研究人员从湖系统中分离了 19 种异常球菌(*Deinococcus*)分离株,构建了一个模型系统,结果表明 MALDI-TOF MS 提供了比 16S rRNA 基因序列分析或 BOX-A1R 指纹图谱更高的分类学分辨率^[38]。MALDI-TOF MS 还可用于鉴定根际、叶际细菌的组成和多样性,并鉴定引起植物病害的新细菌种类,所以可将其应用于环境样品中新菌株和性状的鉴定,以及不同环境中细菌的生物多样性研究^[36]。

空气中的病原性微生物污染是人们日益关

注的公共卫生和安全性问题,为了防治大气污染,需要将其快速、准确地鉴定。有研究将MALDI-TOF MS用于多种大气污染物的快速鉴别,从不同地点(医院、大学和家禽屠宰场)收集的400个空气样本中,129种异构体中的119种(92.5%)被鉴定,该技术对监测空气污染物是有效的^[39]。在临床上,新生儿被耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant staphylococcus aureus, MRSA)侵袭会导致严重感染,而且该菌在病房中极易传播。尽早发现MRSA菌种,快速鉴定出MRSA的分离株是非常有必要的,对迅速采取适当的感染控制措施具有重要意义。通过MALDI-TOF MS分型方法快速确认克隆菌株,能控制细菌在多个医院内或跨多个医院的传播,有助于改善疫情的管理^[40]。研究表明脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)以及MALDI-TOF MS对于鉴定MRSA菌株具有良好的一致性, MALDI-TOF MS分型表现出良好的可分型性和鉴别能力, MALDI-TOF MS是一种非常好的分型工具^[41]。大量研究验证了MALDI-TOF MS在环境细菌鉴定中的性能,结论为该技术对环境微生物是有用且适用的。随着参考数据库的进一步改进,由于其节省时间和成本效益,应鼓励其在环境研究中的常规应用。

2.4 MALDI-TOF MS 对其他领域的鉴定

MALDI-TOF MS还可应用于流行病学的研究、生物制剂的检测、抗生素耐药性的检测、血清学检测中以及尿和脑脊液中微生物的鉴定^[42]。研究表明MALDI-TOF MS可用于临床标本鉴定多种病毒,如人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)、肠道病毒和流感病毒^[43-44];还能作为附加工具对动物如臭虫^[45]、蚊子^[46]及虱子^[47]等进行鉴定,有研究表明该技术在昆虫学调查中可以作为最有前途的工具^[46];也可以对提取的成分如蓖麻毒素进行鉴定评价样品的毒

性^[48],检测药品中的污染菌,为预防微生物污染提供早期防控,保障中药饮片的用药安全^[11];还可对过甲基化或苯并咪唑衍生的多糖进行测定,为多糖的分析提供一种新的可能^[49],是一种成分分离与检测中快速且有效的方法。因此, MALDI-TOF MS是一种极具开发性并且潜力极大的技术方法,随着科技的发展,将在更多领域得到应用。

3 MALDI-TOF MS 在微生物鉴定方面的局限性

MALDI-TOF MS将微生物鉴定错误或未鉴定的根本原因是数据库中的错误、缺失或参考光谱不完整^[50]。幽门螺杆菌的鉴定准确性很低,因为目前数据库中该物种的质谱较少。随着光谱数据库的不断丰富和光谱质量的提高, MALDI-TOF MS将在临床实验室得到更广泛的应用^[51]。因为物种之间的亲缘关系非常密切,当具有几乎相同的质谱时需要一些生化测试来区分,通过表型方法和血清学试验进一步证实。志贺菌和大肠杆菌由于图谱相似,无法用MALDI-TOF MS准确鉴定^[52]。傅里叶变换红外吸收光谱仪(fourier transform infrared absorption spectrometer, FTIR)是一种很有发展潜力的细菌分型工具,采用MALDI-TOF MS和FTIR技术对14株大肠杆菌和9株志贺氏菌进行了分型, FTIR结合MALDI-TOF MS的分型准确率为100%,比单独使用MALDI-TOF MS(65.2%)和FTIR(78.3%)分型的准确率高^[3]。因此FTIR可作为MALDI-TOF MS的补充用于微生物的鉴定和分型。

菌株的来源会影响MALDI-TOF MS的鉴定结果,研究MALDI-TOF MS用于鉴定洋葱芽孢杆菌复合物的应用,洋葱芽孢杆菌复合物来自3份

不同的临床样品和环境土壤样品,与来自临床样品的菌株相比,环境菌株的鉴定准确性明显较低^[53-54]。由于许多菌株存在于混合物和生物膜中,使得它们的准确鉴定具有一定的挑战性,而从多菌样本中分离和培养纯培养物最为关键,而且蛋白质表达的模式会随着混合物的培养条件而变化^[55]。因此在 MALDI-TOF MS 的菌种鉴定中,样品制备方法、基质溶液和培养条件对 MALDI-TOF MS 鉴定在物种水平上起着决定性的作用。分枝杆菌属、诺卡氏菌属和丝状真菌具有复杂的壁结构,导致用基质过程提取蛋白质较差,甲酸提取法可以提高萃取效率^[56]。鉴定细胞壁厚或核糖体蛋白少的菌株,建议采用裂解破壁、蛋白抽取等方法富集光谱,提高识别能力^[57]。然而未知细菌的培养基选择取决于疾病的临床表征,不易标准化,培养基类型对鉴定的影响可能具有特异性,而不是与所有被检细菌有关^[58]。根据特定的细菌代表和菌株要求,标准化培养条件和样品制备方案,利用获得的质谱来更新和修改参考数据库,有利于提高 MALDI-TOF MS 的准确性。

4 小结

随着病原体流行病学的变化,许多以前从未报道过的微生物已成为人类病原体,并且抗菌药物的敏感性不同,抗真菌耐药性成为临床一大难题, MALDI-TOF MS 的发展为抗菌药敏研究提供了一种新的思路^[59]。随着分子诊断技术的进步,分类学也在发生变化,研究表明 MALDI-TOF-MS 是一种准确、可靠和快速的诊断技术,可用于鉴定新出现的重要的临床致病菌, MALDI-TOF MS 不仅可鉴定在固体培养基上培养的菌株,还能直接从血液培养物、脑脊液和尿液中鉴定菌株^[60]。MALDI-TOF MS 技术在生态学研究具有极大的潜力,因为其在蛋白质指纹

图谱方面具有很高的灵敏度和准确性。本课题组将 MALDI-TOF MS 应用于中药中菌落的研究,鉴定出三七药材中的污染菌多为芽孢杆菌,后期三七灭菌中可集中关注消杀此类微生物,以此来保证中药的安全性及有效性,同时要注重高温对三七中主要有效成分的影响^[12]。然而,由于使用仪器自带参考数据库的库存资源有限、操作失误以及部分菌落的生长状况不好,导致少部分菌种未被鉴定,后期还需借助传统生化鉴定和高通量测序进一步进行确定。MALDI-TOF-MS 技术也在新物种的鉴定上具有很大的潜力,为探究未知物种提供了一定的基础。

随着技术和生物信息学工具的进一步发展, MALDI-TOF MS 的局限性将不再限制其在微生物学领域的应用,并且还在生物制剂、昆虫学和中药等领域发挥其研究价值。研究表明, MALDI-TOF MS 结合其他技术的应用在未来的发展中可能会比现在更为广泛。在国外的研究报告中, MALDI-TOF MS 技术已非常普遍地应用于微生物分型研究和耐药细菌的检测,而其在国内的试验研究中较为普遍,应用方面还需要继续加强以实现其价值。

REFERENCES

- [1] 秦晓东, 赵瑜, 杭太俊, 尹利辉, 宋敏. 分子光谱法在微生物鉴别和生物制品及生化药品质量控制中的应用[J]. 中国药品标准, 2021, 22(4): 324-329.
QIN XD, ZHAO Y, HANG TJ, YIN LH, SONG M. Application of molecular spectroscopy on microbiological identification and quality control of biological products and biochemical drugs[J]. Drug Standards of China, 2021, 22(4): 324-329 (in Chinese).
- [2] MARTINY D, BUSSON L, WYBO I, EL HAJ RA, DEDISTE A, VANDENBERG O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(4): 1313-1325.
- [3] FENG B, SHI HM, XU FX, HU FP, HE J, YANG HY,

- DING CF, CHEN WX, YU SN. FTIR-assisted MALDI-TOF MS for the identification and typing of bacteria[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1111: 75-82.
- [4] 李茹鑫, 杨靖, 赵建宏. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在细菌分型中的应用进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(11): 890-893.
- LI RX, YANG J, ZHAO JH. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in bacterial typing[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2017, 40(11): 890-893 (in Chinese).
- [5] 田月如, 关明, 李敏. MALDI-TOF MS 技术在临床微生物诊断应用中的挑战[J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(8): 559-562.
- TIAN YR, GUAN M, LI M. The challenge of MALDI-TOF MS technique in clinical microbiological diagnosis and application[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2018, 41(8): 559-562 (in Chinese).
- [6] 张霄霄, 邵海连, 戈伟, 杨铭, 汪定成, 董轲. MALDI-TOF MS 在病原微生物鉴定中的临床意义[J]. *临床医学研究与实践*, 2021, 6(24): 117-119.
- ZHANG XX, SHAO HL, GE W, YANG M, WANG DC, DONG K. Clinical significance of MALDI-TOF MS in identification of pathogenic microorganisms[J]. *Clinical Research and Practice*, 2021, 6(24): 117-119 (in Chinese).
- [7] 王海花, 张晓峰, 苗丽. MALDI-TOF MS 技术在病原菌检测与鉴定中的应用研究[J]. *中国兽医杂志*, 2017, 53(2): 62-65.
- WANG HH, ZHANG XF, MIAO L. Study on application of MALDI-TOF MS technology in detection and identification of pathogenic bacteria[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 53(2): 62-65 (in Chinese).
- [8] SINGHAL N, KUMAR M, KANAUIA PK, VIRDI JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 791.
- [9] 李辉, 余萌, 刘立科, 马仕洪, 绳金房. 现代微生物鉴定技术在药品质量控制中的应用研究进展[J]. *中国医药工业杂志*, 2021, 52(3): 312-319.
- LI H, YU M, LIU LK, MA SH, SHENG JF. Research progress on the application of modern microorganism identification technology in pharmaceutical quality control[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2021, 52(3): 312-319 (in Chinese).
- [10] 靳颖, 王俊妨, 崔云涛, 刘锦. 基质辅助激光解析飞行时间质谱在临床病原菌检测中的应用进展[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2012, 12(3): 238-240.
- JIN Y, WANG JF, CUI YT, LIU J. Latest application of matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in identification of clinical pathogens[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2012, 12(3): 238-240 (in Chinese).
- [11] 白雯静, 刘兴国, 田妮娜, 周斌, 刘荔. 基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法的 3 种中药材中污染菌的快速鉴定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(7): 2650-2655.
- BAI WJ, LIU XG, TIAN NN, ZHOU B, LIU L. Rapid identification of microbial contamination for 3 kinds of Chinese medicinal herbs based on the matrix assisted laser analytical ionization time of flight mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(7): 2650-2655 (in Chinese).
- [12] 白雯静, 李志俊, 周斌, 徐雪梅, 袁顺捷. 三七药材中微生物污染的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(8): 3405-3409.
- BAI WJ, LI ZJ, ZHOU B, XU XM, YUAN SJ. Study on microbial contamination of *Panax notoginseng*[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(8): 3405-3409 (in Chinese).
- [13] PETROTCHENKO EV, BORCHERS CH. Modern mass spectrometry-based structural proteomics[J]. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 2014, 95: 193-213.
- [14] CARBONNELLE E, MESQUITA C, BILLE E, DAY N, DAUPHIN B, BERETTI JL, FERRONI A, GUTMANN L, NASSIF X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory[J]. *Clinical Biochemistry*, 2011, 44(1): 104-109.
- [15] 胡继红, 马筱玲, 王辉, 张建中, 罗燕萍, 鲁辛辛, 苏建荣, 张嵘, 赵虎, 余方友, 孙自镛, 顾兵, 刘小平, 赵建宏, 胡云建, 胡志东, 吕火焯, 周铁丽, 金大智, 刘文恩, 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.
- HU JH, MA XL, WANG H, ZHANG JZ, LUO YP, LU XX, SU JR, ZHANG R, ZHAO H, YU FY, SUN ZY, GU B, LIU XP, ZHAO JH, HU YJ, HU ZD, LÜ HY, ZHOU TL, JIN DZ, LIU WE, et al. Expert consensus on standardized operation of MALDI-TOF MS in clinical microbiological identification[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2019, 42(4): 241-249 (in Chinese).
- [16] 张金艳, 郭秀娟. 质谱仪在临床病原菌感染诊断中的应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(11): 879-880.
- ZHANG JY, GUO XJ. Application of mass spectrometer

- in the diagnosis of clinical pathogen infection[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2014, 37(11): 879-880 (in Chinese).
- [17] JANG KS, KIM YH. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications[J]. Journal of Microbiology, 2018, 56(4): 209-216.
- [18] HOSSEINI S, MARTINEZ-CHAPA SO. Principles and mechanism of MALDI-TOF MS analysis[M]// Fundamentals of MALDI-ToF MS Analysis. SpringerBriefs in Applied Science and Technology. Singapore: Springer, 2017: 1-19.
- [19] 王淑娟, 刁菁, 樊英, 李乐, 刘洪军, 叶海斌. 质谱技术在微生物鉴定和检测中的应用[J]. 河北渔业, 2019(10): 37-40, 62.
- WANG SX, DIAO J, FAN Y, LI LE, LIU HJ, YE HB. Application of mass spectrometry in microbial identification and detection[J]. Hebei Fisheries, 2019(10): 37-40, 62 (in Chinese).
- [20] FOSTER AGW. Rapid Identification of microbes in positive blood cultures by use of the vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(11): 3717-3719.
- [21] SCHUBERT S, KOSTRZEWA M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2017, 23: 17-20.
- [22] GE MC, KUO AJ, LIU KL, WEN YH, CHIA JH, CHANG PY, LEE MH, WU TL, CHANG SC. Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: success rate, economic analysis, and clinical outcome[J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2017, 50(5): 662-668.
- [23] WILEN CB, MCMULLEN AR, BURNHAM CA D. Comparison of sample preparation methods, instrumentation platforms, and contemporary commercial databases for identification of clinically relevant mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(7): 2308-2315.
- [24] MONTGOMERY S, ROMAN K, NGYUEN L, CARDENAS AM, KNOX J, TOMARAS AP, GRAF EH. Prospective evaluation of light scatter technology paired with matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry for rapid diagnosis of urinary tract infections[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55(6): 1802-1811.
- [25] TANG M, YANG J, LI Y, ZHANG LH, PENG Y, CHEN WB, LIU JB. Diagnostic accuracy of MALDI-TOF mass spectrometry for the direct identification of clinical pathogens from urine[J]. Open Medicine (Warsaw, Poland), 2020, 15: 266-273.
- [26] LI RX, XIAO D, YANG J, SUN SJ, KAPLAN S, LI ZR, NIU YN, QIANG CX, ZHAI Y, WANG XM, ZHAO XZ, ZHAO BX, WELKER M, PINCUS DH, JIN DZ, KAMBOJ M, ZHENG GH, ZHANG GJ, ZHANG JZ, TANG YW, et al. Identification and characterization of *Clostridium difficile* sequence type 37 genotype by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2018, 56(5): e01990-e01917.
- [27] LING HZ, YUAN ZJ, SHEN JL, WANG ZX, XU YH. Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinical pathogenic fungi: a meta-analysis [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(7): 2573-2582.
- [28] FARON ML, BUCHAN BW, HYKE J, MADISEN N, LILLIE JL, GRANATO PA, WILSON DA, PROCOP GW, NOVAK-WEEKLEY S, MARLOWE E, CUMPIO J, GRIEGO-FULLBRIGHT C, KINDIG S, TIMM K, YOUNG S, LEDEBOER NA. Multicenter evaluation of the bruker MALDI biotyper CA system for the identification of clinical aerobic gram-negative bacterial isolates[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0141350.
- [29] YE NF, ZHANG BY, LING HZ, HUANG Y, XU YH, WANG ZX. Use of MALDI-TOF MS for rapid identification of clinical bacterial strains that are uncommon or difficult to identify[J]. Annals of Clinical and Laboratory Science, 2018, 48(5): 646-653.
- [30] 谢文佳, 杨向莹, 张捷, 冯波. 食源性微生物溯源技术研究进展[J]. 食品科技, 2022, 47(6): 316-321.
- XIE WJ, YANG XY, ZHANG J, FENG B. Research progress on traceability technology of food-borne microorganisms[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(6): 316-321 (in Chinese).
- [31] 杜金婷, 张雁, 李雁, 王佳佳, 廖娜, 钟立煌, 骆碧群, 林江. 茶皂素对食源性腐败酵母的抑菌能力及作用机理[J]. 现代食品科技, 2022, 38(5): 118-125, 327.
- DU JT, ZHANG Y, LI Y, WANG JJ, LIAO N, ZHONG LH, LUO BQ, LIN J. Antibacterial activity and mechanism of tea saponin against foodborne spoilage yeasts[J]. Modern Food Science & Technology, 2022, 38(5): 118-125, 327 (in Chinese).

- [32] 葛素君, 王志刚, 许际华, 冯济富, 沈伟伟, 卜建国, 陈兴利, 徐佳. 白假丝酵母致食源性疾病的病原学检测与鉴定[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 2030-2032, 2047.
- GE SJ, WANG ZG, XU JH, FENG JF, SHEN WW, PU JG, CHEN XL, XU J. Detection and evaluation on etiology of *Candida albicans* from food source disease[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18(10): 2030-2032, 2047 (in Chinese).
- [33] PAVLOVIC M, MEWES A, MAGGIPINTO M, SCHMIDT W, MESSELHÄUBER U, BALS LIEMKE J, HÖRMANSDORFER S, BUSCH U, HUBER I. MALDI-TOF MS based identification of food-borne yeast isolates[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 106: 123-128.
- [34] QUINTILLA R, KOLECKA A, CASAREGOLA S, DANIEL HM, HOUBRAKEN J, KOSTRZEWA M, BOEKHOUT T, GROENEWALD M. MALDI-TOF MS as a tool to identify foodborne yeasts and yeast-like fungi[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 266: 109-118.
- [35] YAN W, QIAN J, GE Y, YE KP, ZHOU CS, ZHANG HS. Principal component analysis of MALDI-TOF MS of whole-cell foodborne pathogenic bacteria[J]. Analytical Biochemistry, 2020, 592: 113582.
- [36] ASHFAQ MY, DA'NA DA, AL-GHOUTI MA. Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: a review[J]. Journal of Environmental Management, 2022, 305: 114359.
- [37] MOUSSA M, CAUVIN E, Le PLOUFFLE A, LUCAS O, BIDAULT A, PAILLARD C, BENOIT F, THUILLIER B, TREILLES M, TRAVERS MA, GARCIA C. A MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. potentially pathogenic to marine mollusks[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(6): 2527-2539.
- [38] TUOHY JM, MUELLER-SPITZ SR, ALBERT CM, SCHOLZ-NG SE, WALL ME, NOUTSIOS GT, GUTIERREZ AJ, SANDRIN TR. MALDI-TOF MS affords discrimination of *Deinococcus aquaticus* isolates obtained from diverse biofilm habitats[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2442.
- [39] ELBEHIRY A, AL-DUBAIB M, MARZOUK E, ALBEJAIDI FM, RADWAN MA, ALZABEN F, ALHARBI A. Proteomic analysis and molecular characterization of airborne bioaerosols in indoor and outdoor environment in Al-qassim region, Saudi Arabia[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2019, 13(2): 1041-1052.
- [40] LAING IA, GIBB AP, MCCALLUM A. Controlling an outbreak of MRSA in the neonatal unit: a steep learning curve[J]. Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition, 2009, 94(4): F307-F310.
- [41] STEENSELS D, DEPLANO A, DENIS O, SIMON A, VERROKEN A. MALDI-TOF MS typing of a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a neonatal intensive care unit[J]. Acta Clinica Belgica, 2017, 72(4): 219-225.
- [42] ÍÑIGO M, COELLO A, FERNÁNDEZ-RIVAS G, RIVAYA B, HIDALGO J, DOLORES QUESADA M, AUSINA V. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples, combining urine screening methods and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2016, 54(4): 988-993.
- [43] CAI XS, GUAN QH, HUAN Y, LIU ZY, QI JH, GE SC. Development of high-throughput genotyping method of all 18 HR HPV based on the MALDI-TOF MS platform and compared with the Roche Cobas 4800 HPV assay using clinical specimens[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 825.
- [44] PENG J, YANG F, XIONG ZH, GUO JH, DU J, HU YF, JIN Q. Sensitive and rapid detection of viruses associated with hand foot and mouth disease using multiplexed MALDI-TOF analysis[J]. Journal of Clinical Virology, 2013, 56(2): 170-174.
- [45] BENKACIMI L, GAZELLE G, EL HAMZAOU B, BÉRENGER JM, PAROLA P, LAROCHE M. MALDI-TOF MS identification of *Cimex lectularius* and *Cimex hemipterus* bedbugs[J]. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2020, 85: 104536.
- [46] TANDINA F, NIARÉ S, LAROCHE M, KONÉ AK, DIARRA AZ, ONGOIBA A, BERENGER JM, DOUMBO OK, RAOULT D, PAROLA P. Using MALDI-TOF MS to identify mosquitoes collected in Mali and their blood meals[J]. Parasitology, 2018, 145(9): 1170-1182.
- [47] BENYAHIA H, OUARTI B, DIARRA AZ, BOUCHEIKHCHOUKH M, MEGUINI MN, BEHIDJI M, BENAKHLA A, PAROLA P, ALMERAS L. Identification of lice stored in alcohol using MALDI-TOF MS[J]. Journal of Medical Entomology, 2021, 58(3): 1126-1133.
- [48] SOUSA RB, LIMA KSC, SANTOS CGM, FRANÇA

- TCC, NEPOVIMOVA E, KUCA K, DORNELAS MR, LIMA ALS. A new method for extraction and analysis of ricin samples through MALDI-TOF-MS/MS[J]. *Toxins*, 2019, 11(4): 201.
- [49] HUNG WT, WANG SH, CHEN YT, YU HM, CHEN CH, YANG WB. MALDI-TOF MS analysis of native and permethylated or benzimidazole-derivatized polysaccharides[J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2012, 17(5): 4950-4961.
- [50] TSUCHIDA S, UMEMURA H, NAKAYAMA T. Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology[J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2020, 25(20): 4775.
- [51] HELENA B, CHLOË DW, SOFIE DB, FOX JAMES G, STEFFEN B, ANNEMIEKE S, FILIP B, FREDDY H. Differentiation of gastric *Helicobacter* species using MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Pathogens*, 2021, 10(3): 366.
- [52] DEVANGA RAGUPATHI NK, MUTHUIRULANDI SETHUVEL DP, INBANATHAN FY, VEERARAGHAVAN B. Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: challenges and strategies[J]. *New Microbes and New Infections*, 2017, 21: 58-62.
- [53] FURLAN JPR, PITONDO-SILVA A, SANTOS BRAZ V, GALLO IFL, STEHLING EG. Evaluation of different molecular and phenotypic methods for identification of environmental *Burkholderia cepacia* complex[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(3): 39.
- [54] VICENZI FJ, PILLONETTO M, SOUZA HA, PALMEIRO JK, RIEDI CA, ROSARIO-FILHO NA, DALLA-COSTA LM. Polyphasic characterisation of *Burkholderia cepacia* complex species isolated from children with cystic fibrosis[J]. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2016, 111(1): 37-42.
- [55] SANDRIN TR, DEMIREV PA. Characterization of microbial mixtures by mass spectrometry[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2018, 37(3): 321-349.
- [56] ROCCA MF, ZINTGRAFF JC, DATTERO ME, SANTOS LS, LEDESMA M, VAY C, PRIETO M, BENEDETTI E, AVARO M, RUSSO M, NACHTIGALL FM, BAUMEISTER E. A combined approach of MALDI-TOF mass spectrometry and multivariate analysis as a potential tool for the detection of SARS-CoV-2 virus in nasopharyngeal swabs[J]. *Journal of Virological Methods*, 2020, 286: 113991.
- [57] da SILVA AMARAL L, RODRIGUES-FILHO E, KUBICEK CP, HERWIG C, MARCHETTI-DESCHMANN M, ALLMAIER G. Optimization of sample preparation for intact cell mass spectrometry (matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometry) of endophytic *Xylaria*[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2018, 32(10): 815-823.
- [58] TOPIĆ POPOVIĆ N, KAZAZIĆ SP, BOJANIĆ K, STRUNJAK-PEROVIĆ I, ČOŽ-RAKOVAC R. Sample preparation and culture condition effects on MALDI-TOF MS identification of bacteria: a review[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2021.
- [59] DELAVY M, dos SANTOS AR, HEIMAN CM, COSTE AT. Investigating antifungal susceptibility in *Candida* species with MALDI-TOF MS-based assays[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 19.
- [60] YI QL, XIAO M, FAN X, ZHANG G, YANG Y, ZHANG JJ, DUAN SM, CHENG JW, LI Y, ZHOU ML, YU SY, HUANG JJ, CHEN XF, HOU X, KONG FR, KUDINHA T, XU YC. Evaluation of autof MS 1000 and vitek MS MALDI-TOF MS system in identification of closely-related yeasts causing invasive fungal diseases[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 628828.