

- го теста с препаратом, содержащим рекомбинантный белок CFP-10-ESAT-6 и лабораторного теста QuantiFERON-GIT. *Туберкулез и болезни легких*. 2012; 89 (10): 16–9.
7. Яблонский П.К., Довгальок И.Ф., Старшинова А.А., Якунова О.А. Значение современных иммунологических тестов в диагностике туберкулеза у детей. *Клиническая иммунология*. 2013; 15 (1): 37–44.
 8. Лозовская М.Э., Белушков В.В., Гурина О.П., Васильева Е.Б., Ключкова Л.В. Сравнительная оценка инновационных тестов в диагностике латентной и активной туберкулезной инфекции у детей. *Педиатр*. 2014; 5 (3): 46–50.
 9. Владимирский М.А., Мордовская Л.И., Аксенова В.А., Шипина Л.К., Аксенова Е.И., Сергиенко О.В. и др. Разработка и применение отечественной тест-системы диагностики туберкулезного инфицирования на основе количественного анализа индукции интерферона- γ в образцах цельной крови *in vitro* с использованием специфических рекомбинантных антигенов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; (1): 49–54.
 10. Мордовская Л.И., Владимирский М.А., Аксенова В.А., Ефремов Е.Е., Игнашенкова Г.И., Власик Т.Н. Индукция интерферона-гамма в образцах цельной крови *in vitro* – тест для определения туберкулезного инфицирования у детей и подростков. *Туберкулез и болезни легких*. 2009; 86 (6): 19–24.
 4. Menzies D., Pai M., Comstock G. Meta-analysis: New Test for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: Areas of Uncertainty and Recommendations for Research. *Ann. Intern. Med.* 2007; 146: 340–54.
 5. Belushkov V.V., Lozovskaya M.E., Novik G.A., Gurina O.P., Shibakova N.D. Value of a diaskintest and QuantiFERON test in diagnosis of tuberculosis in children. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2012; (7): 34–9. (in Russian)
 6. Slogotskaya L.V., Ivanova D.A., Kochetkov Ya.A., Kulikovskaya N.V., Vaneeva T.V., Filippov A.V. Results of the skin test containing CFP-10-ESAT-6 protein versus the laboratory test QuantiFERON-GIT. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2012; 89 (10): 16–9. (in Russian)
 7. Yablonskiy P.K., Dovgalyuk I.F., Starshinova A.A., Yakunova O.A. Role of modern immunologic tests in diagnostics of tuberculosis in children. *Klinicheskaya immunologiya*. 2013; 15 (1): 37–44. (in Russian)
 8. Lozovskaya M.E., Belushkov V.V., Gurina O.P., Vasil'eva E.B., Klochkova L.V. Comparative evaluation of innovative diagnostic tests for latent and active TB infection in children. *Pediatr*. 2014; 5 (3): 46–50. (in Russian)
 9. Vladimirskiy M.A., Mordovskaya L.I., Aksenova V.A., Shipina L.K., Aksenova E.I., Sergienko O.V. et al. Development and use of national test system on the basis of the quantitative analysis of interferon- γ induction in the samples of whole blood with use of specific recombinant antigens *in vitro* for diagnostics of tubercular infection. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; (1): 49–54. (in Russian)
 10. Mordovskaya L.I., Vladimirskiy M.A., Aksenova V.A., Efremov E.E., Ignashenkova G.I., Vlasik T.N. Induction of interferon-gamma in whole blood samples *in vitro* – test to determine TB infection in children and adolescents. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2009; 86 (6): 19–24. (in Russian)

REFERENCES

1. Aksenova V.A. Tuberculosis in children in Russia. *Tuberkulez i sotsial'no znachimye zabolevaniya*. 2014; (5): 6–14. (in Russian)
 2. Pal'tsev M.A., ed. *Skin Test with the Preparation "Diaskintest" – New Opportunities of Identification of a Tuberculosis Infection*. Moscow: Shiko; 2011. (in Russian)
 3. Arend S., Andersen P., van Meijaarden K. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted anti-genic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *J. Infect. Dis.* 2000; 181: 1850–4.
- Поступила 20.05.16
Принята к печати 30.05.16

МИКРОБИОЛОГИЯ

© ПРИПУТНЕВИЧ Т.В., МЕЛКУМЯН А.Р., 2016

УДК 616-074:543.42.0621.03:616-078

Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ — НОВОЕ СЛОВО В КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Российская Федерация

В конце XX века произошла настоящая революция в области методов, которые могут быть использованы для идентификации возбудителей инфекций, в том числе бактерий. Наряду с культуральной диагностикой появился арсенал молекулярно-генетических методов, а также протеомный анализ, основанный на использовании физических технологий, к числу которых относится матрично-активированная лазерная десорбционная/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия — MALDI-ToF MS.

Мировой опыт применения MALDI-ToF MS для видовой идентификации микроорганизмов, выделенных из клинического материала, подтверждает высокую ценность метода, а потенциальная возможность проводить прямую индикацию бактерий в клиническом материале значительно сокращает сроки выполнения анализов и открывает новые ресурсы для использования в различных алгоритмах микробиологической диагностики.

Ключевые слова: масс-спектрометрия; протеомный анализ; MALDI-ToF MS; идентификация микроорганизмов.

Для цитирования: Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р. Масс-спектрометрия — новое слово в клинической микробиологии.

Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (12): 842-848. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-842-848>

Для корреспонденции: Припутневич Татьяна Валерьевна, д-р мед.наук, зав. отд. микробиологии и клинической фармакологии, e-mail: priput1@gmail.com

Pripitnevich V.M., Melkumyan A.R.

THE MASS-SPECTROMETRY AS A NEW WORD IN CLINICAL MICROBIOLOGY

The academician V.I. Kulakov research center of obstetrics, gynecology and perinatology of Minzdrav of Russia, 117997 Moscow, Russia

In the end of XX century real revolution occurred in field of methods, which can be applied for identification of agents of infections including bacteria. Alongside with cultural diagnostic entered an arsenal of molecular genetic methods and proteomic analysis based on application of physical technologies including matrix activated laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry - MALDI-ToF MS as well.

The international experience of application of MALDI-ToF MS as species identification of microorganisms isolated from clinical samples substantiates high importance of method. The potential possibility of implementing direct indication of bacteria in clinical samples significantly shorten period of implementation of analysis and reveals new resources for implementing in various algorithms of microbiological diagnostic.

Key words: mass-spectrometry; proteomic analysis; MALDI-ToF MS; identification of microorganisms.

For citation: Pripitnevich V.M., Melkumyan A.R. The mass-spectrometry as a new word in clinical microbiology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (12): 842-848. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-842-848>*

For correspondence: Pripitnevich V.M., doctor of medical sciences, head of department of microbiology and clinical pharmacology. e-mail: pripit1@gmail.com

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support.

Received 04.05.2016
Accepted 15.05.2016

История развития масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов. В 2002 г. за разработку метода MALDI-ToF MS анализа японскому инженеру Коити Танака была присуждена Нобелевская премия по химии. С помощью MALDI-ToF MS стало возможным воспроизводить и анализировать крупные биомолекулы (например, рибосомальные белки), дифференцировать различные виды бактерий. В начале XXI столетия метод MALDI-ToF MS анализа был предложен в качестве способа идентификации микроорганизмов, выделенных на питательных средах [1].

В то время как автоматизированные фенотипические и генетические методы интенсивно развивались и использовались в клинических лабораториях по всему миру, применение метода MALDI-ToF MS анализа первоначально ограничивалось научно-исследовательскими лабораториями [2—6]. Однако постепенно и его начали использовать для видовой идентификации и таксономической классификации микроорганизмов [1, 7].

MALDI-ToF MS — автоматизированная молекулярная платформа, которая представляет собой быстрый, простой и недорогой метод видовой идентификации бактерий и грибов. На основе MALDI-ToF MS видовая идентификация может быть осуществлена за минуты, в то время как идентификация по общепринятым тестам занимает от нескольких часов до 2 и более суток. Определить видовую принадлежность бактерий теперь можно за 5—10 мин при низкой стоимости одного исследования (ориентировочно 1,43 евро на 1 штамм по сравнению с 2,2—8,23 евро на штамм при использовании API тест-/автоматизированных систем (VITEK, BioMerieux) или 137 евро на 16S рPHK секвенирование [8]).

Кроме того, создаются системы и базы данных для рутинного использования в микробиологических лабораториях. Несмотря на то что анализ микробных изолятов с помощью MALDI-ToF MS проводится по принципу «отпечатка пальца» (finger print) и основывается на сравнении полученных масс-спектров бактерий с масс-спектрами из баз данных, дискриминационная способность по видам варьирует в зависимости от метода и полноты используемой базы данных [4, 6, 9].

Масс-спектрометрия белков: достоверность идентификации. Начиная с 2000-х годов в мире проводятся исследования по изучению достоверности идентификации различных

видов бактерий, грибов, простейших методом MALDI-ToF MS анализа, а также целесообразности его использования в рутинной практике микробиологических лабораторий. В это время совершенствуются протоколы пробоподготовки, тестируются смеси растворителей с различными концентрациями и соотношениями для получения лизата клеток, анализируются используемые для ионизации образца матрицы, изучается воспроизводимость масс-профилей как для отдельного штамма, так и на уровне родов и видов бактерий [7, 8, 10, 11].

Одной из трудноразрешимых задач масс-спектрометрии является стандартизация пробоподготовки образца при прямом анализе бактерий в биологических жидкостях. Наличие тканевых белков или метаболитов подавляет сигналы биомаркеров, сгенерированных из клеток микроорганизмов во время масс-спектрометрического анализа. Разработка специфических зондов для определенного микроорганизма — вот подход, который может свести к минимуму помехи при анализе. Описан метод детекции бактерий из сложных биологических смесей в сочетании с MALDI-ToF MS, использующий аффинную съемку с применением лектин-иммобилизирующего субстрата как ловушку следов бактерии в биологических смесях [11].

Термическая обработка и гидролизметилирование-GC с MALDI MS применены в качестве дополнительного средства при предварительной обработке образца непосредственно перед анализом клеток *Escherichia coli* [12]. Еще одной модификацией метода является Surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (SELDI-MS), основанная на сохранении вещества на мишени до MALDI MS анализа, когда с помощью аффинной хроматографии химически модифицированные белки фиксируются на ее поверхности [10]. При изучении штаммов *Neisseria meningitidis* использована SELDI-MS для выявления потенциальных биологических маркеров [13]. В результате создана модель, отличающая их от близкородственных видов нейссерий. Анализ применения метода SELDI-ToF MS для идентификации нейссерий (350 штаммов *Neisseria gonorrhoeae* и других видов), проведенный [14] в 2005 г., способствовал открытию 20 различных пиков, которые имеют первостепенное значение для идентификации возбудителя. Модель выполнена с 95,7% чувствительностью и 97,1% специфичностью метода; это

свидетельствует о том, что на данную технологию следует обратить внимание при создании комплексной платформы для быстрой идентификации клинически значимых возбудителей [14].

Пробоподготовка в масс-спектрометрии как инструмент повышения достоверности идентификации микроорганизмов. MALDI-ToF MS анализ, как правило, оказывается более чувствительным, чем другие методы ионизации. Реализация данного анализа в клинической микробиологической лаборатории в значительной степени зависит от дальнейшей стандартизации протоколов пробоподготовки, что является одной из ключевых задач при получении высоковоспроизводимых результатов [6, 10]. Для идентификации с помощью MALDI-ToF MS бактерий, выросших на питательных средах, требуется простая методика пробоподготовки: чистая культура или изолированная колония и специальная матрица, которая играет ключевую роль в постановке MALDI-ToF MS исследования [15]. Ее назначением является поглощение энергии лазерного света, вызванного испарением вещества на мишени. В качестве такой матрицы используются несколько химических веществ.

В ходе отработки протокола на *E. coli* выбран оптимальный раствор для лизиса бактерий (50% ацетонитрила, 2,5% трифторуксусной кислоты), позволяющий получить качественные масс-спектры при использовании любого матричного вещества [6]. Установлено влияние вида матрицы на состав и качество получаемых масс-спектров и выбрана предпочтительная матрица, состоящая из 3,5-диметокси-4-гидроксикоричной кислоты.

При отработке протоколов пробоподготовки для идентификации грамположительных микроорганизмов изучалось влияние на достоверность анализа способа нанесения материала на мишень. Приведены результаты идентификации с применением двух методов подготовки бактерий [16]. В одном случае использовался способ прямого, без дополнительной обработки, нанесения изолированной колонии тонким мазком на ячейку мишени. Для получения лучших спектров и повышения уровня достоверности идентификации (score) применялся второй способ — экстракция белка. Этот процесс достаточно длительный, поэтому для увеличения достоверности идентификации пробоподготовку оптимизировали путем использования промежуточного варианта с наложением матрицы (5% муравьиной кислоты) непосредственно на высушенный препарат с культурой. Оценены четыре различных способа нанесения на пластину: толстые и тонкие мазки с наложением и без наложения матрицы, с экстракцией белка и без нее. Проанализированы результаты идентификации 239 изолятов аэробов и установлена абсолютная полезность матрицы по сравнению с простым нанесением колонии на мишень.

MALDI-ToF MS для идентификации грамотрицательных и грамположительных бактерий. В России изучение прямого MALDI-ToF масс-спектрометрического профилирования для типирования и видовой идентификации бактерий впервые было проведено на клинических изолятах *N. gonorrhoeae* в 2005 г. [17]. Была оценена вариабельность MALDI-ToF масс-профилей, отснятых по единому протоколу, внутри популяции бактерий и дифференциального анализа между изолятами внутри одного рода. Результаты исследования свидетельствуют о возможности проводить видовую идентификацию *N. gonorrhoeae* методом MALDI-ToF MS.

Проанализирован механизм определения видов грамотрицательных бактерий с помощью MALDI-ToF MS в сравнении с идентификацией при использовании автоматизированной системы BD Phoenix (Becton Dickinson, США), проверена коллекция штаммов, состоящая из 440 обычных и редко встречающихся видов микроорганизмов [18]. Получено не-

значимое различие между двумя системами при идентификации наиболее распространенных видов грамотрицательных бактерий, а при идентификации редко встречающихся видов метод MALDI-ToF MS анализа оказался точнее, чем система BD Phoenix.

При разработке протокола пробоподготовки образцов 208 изолятов энтеробактерий и 252 неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов (НГОБ) для масс-спектрометрического анализа была применена техника тонкого и толстого мазка с наложением матрицы [19]. Толстые мазки с матрицей обеспечили более достоверную идентификацию энтеробактерий по сравнению с тонкими мазками, а при идентификации НГОБ существенных различий между толщиной мазка и образцами с матрицей не отмечено.

Белковые спектры, полученные методом MALDI-ToF MS анализа 559 клинических изолятов НГОБ, изучены и сопоставлены с 58 референсными штаммами микроорганизмов [20]. Точно определены 549 изолятов, а девять *B. cerealis* и один *R. mannitolilytica* идентифицированы как соответствующие роду, но методом секвенирования отнесены к другому виду. После дополнения базы данных масс-спектрами этих видов достоверность их идентификации существенно повысилась.

Фенотипические методы идентификации бактерий в большей степени зависят от профессионализма исполнителя и часто оказываются субъективными при интерпретации результатов. Метод MALDI-ToF MS анализа может быть использован для быстрой идентификации грамположительных бактерий, в том числе *S. aureus*, коагулазонегативных стафилококков (CoNS), стрептококков, листерий, коринебактерий [4, 8, 10, 21].

Идентификацию стрептококков обычно проводят по биохимическим тестам, по растворимости в солях желчи, чувствительности к оптохину, бацитрацину, способности агглютинироваться групповыми специфическими сыворотками [22, 23].

MALDI-ToF MS дает возможность быстро и с высокой точностью идентифицировать β-гемолитические стрептококки. Были изучены 99 клинических изолятов β-гемолитических стрептококков и показано, что при MALDI-ToF MS анализе создаются уникальные спектры, которые более схожи и стабильны, чем у других групп стрептококков [22]. Штаммы, используемые в исследовании, идентифицированы параллельно тест-системой для стрептококков (RapID 32, BioMérieux) и методом секвенирования гена 16S рПНК. Авторы продемонстрировали 100% совпадение полученных результатов всеми способами и пришли к выводу, что MALDI-ToF MS обладает быстрой и точной способностью идентификации β-гемолитических стрептококков [22].

Идентификация α-гемолитических стрептококков представляет трудности, что связано со значительной их межвидовой генетической схожестью, методологическими сложностями, неопределенной и постоянно меняющейся номенклатурой и таксономией [22].

Использование MALDI-ToF MS, судя по результатам различных работ, показало его пока что ограниченные возможности в области точной идентификации α-гемолитических стрептококков — в частности, отличия *S. pneumoniae* от *S. mitis/oralis*. Несмотря на их генетическую родственность, идентификация этих изолятов является клинически значимой и важной. Исследования зарубежных и отечественных авторов показывают сходные результаты — ошибки при идентификации *S. pneumoniae* методом MALDI-ToF MS [24, 25].

Исследование возможностей использования прямого MALDI-ToF MS профилирования клинических изолятов *S. pneumoniae* ($n = 25$) показало, что некоторые из них имели морфотип, отличный от классических пневмококков, но

идентифицировались как *S. pneumoniae* согласно биохимическим и антигенным свойствам [25]. Сравнительный анализ накопленных масс-спектров (пик-листов) продемонстрировал существенную неоднородность исследуемой группы. Мультилокусное типирование исследуемой выборки изолятов пневмококка позволило установить их различную видовую принадлежность: 19 изолятов идентифицированы как *S. pneumoniae* и 6 — как не пневмококки. В силу противоречивости информации, представленной в мировых базах данных, идентификация этих изолятов оказалась невозможной. Сопоставление полученного в ходе кластерного анализа масс-спектрометрических профилей распределения изолятов с данными мультилокусного типирования свидетельствует о возможности использования прямого белкового профилирования пока лишь как дополнительного метода идентификации и дискриминации стрептококков [26].

Реализация MALDI-ToF MS в клинической микробиологии изменила традиционный подход к дифференциации стафилококков, при котором, как правило, проводятся различия лишь между *S. aureus* и группой CoNS.

Коагулазоотрицательные стафилококки (CoNS) — группа грамположительных кокков, представленная большим количеством видов, многие из которых имеют значительные генетические и фенотипические гомологии. В повседневной практике бактериологических лабораторий идентификация стафилококков этой группы, как правило, не проводится из-за дороговизны исследования. При идентификации CoNS молекулярные методы на основе секвенирования последовательности 16S рРНК предпочтительнее и точнее автоматизированных биохимических систем, однако их применение обходится дороже и носит ограниченный характер. Использование MALDI-ToF MS для идентификации CoNS может решить проблему их рутинного тестирования, вытеснить сложные, трудоемкие фенотипические и молекулярно-генетические методы, тем самым повысив качество работы лаборатории и скорость выдачи результатов [16].

MALDI-ToF MS и «трудно идентифицируемые» бактерии. Существует целый ряд микроорганизмов, которые плохо поддаются идентификации известными биохимическими тестами и традиционно считаются «трудно идентифицируемым» — к примеру, анаэробные бактерии. Судя по первым сообщениям микробиологов, изучающих возможности применения метода MALDI-ToF MS анализа для идентификации анаэробных бактерий, очевидно, что в их руках оказался, пожалуй, лучший инструмент для идентификации данной группы микроорганизмов [26, 27].

В исследовании, проведенном на 277 изолятах 9 видов бактериоидов, методом MALDI-ToF MS анализа получена идентификация микроорганизмов с точностью до 97% [27]. В ходе того же исследования протестированы 283 клинически значимых изолята других анаэробных бактерий. С высокой степенью достоверности (score 2 и выше) до вида идентифицированы 218 (77%) изолятов, до рода (score 1,7—2) — 31 (10,95%) изолят, 34 (12%) не идентифицированы (score ниже 1,7). Для 44 изолятов при сравнении с общепринятыми способами идентификации были получены противоречивые результаты, а при определении последовательности гена 16S рРНК в 41 случае подтверждены результаты MALDI-ToF MS идентификации, и 3 (0,7%) изолята оказались идентифицированы ошибочно. Выводы, сделанные в ходе этого исследования, определили необходимость оптимизации протоколов пробоподготовки для анализа анаэробных бактерий методом MALDI-ToF MS и пополнения базы данных программного обеспечения [27].

К представителям «трудно идентифицируемых» микроорганизмов относятся и лактобациллы, биохимические и морфологические свойства которых являлись до недавнего

времени основными и единственными критериями межродовой и видовой дифференциации. Развитие и внедрение новых молекулярных методов и MALDI-ToF MS позволило провести идентификацию бактерий рода *Lactobacillus* и установить их высокую гетерогенность [28]. Метод MALDI-ToF MS анализа представляет собой альтернативу имеющимся способам идентификации лактобацилл и открывает новые перспективы для изучения их роли в формировании нормоценозов различных биотопов человека [29, 30].

MALDI-ToF MS для идентификации дрожжевых грибов. MALDI-ToF MS может произвести революцию в медицинской микологии благодаря увеличению точности и скорости идентификации грибов [31—33]. Определение видовой принадлежности грибов основано на использовании селективных питательных сред, изучении морфологических особенностей колоний гриба, микроскопии клеток, применении различных тест-систем и автоматизированных биохимических анализаторов, при этом результаты не всегда могут оказаться точными [31—33].

Оценена возможность применения метода MALDI-ToF MS для быстрой идентификации клинических изолятов дрожжевых грибов [31]. Изучено 18 видов коллекционных штаммов грибов и 267 клинических изолятов родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Blastoschizomyces* ($n = 250$). Результаты сравнивались с данными, полученными с помощью общепринятых методов, в том числе API ID 32C (BioMérieux, Франция). Идентификация методом MALDI-ToF MS достигнута для 247 (92,5%) клинических изолятов. Для 20 изолятов, не идентифицированных методом MALDI-ToF MS анализа, но исследованных методом мини-секвенирования генов 26S рРНК, отсутствовали спектры в базе данных, и требовалось дополнение масс-спектров соответствующих эталонных штаммов. Полученные спектры и значения score указывали на наличие отсутствующего микроорганизма, и после дополнения базы данных все штаммы были идентифицированы до вида [31].

В проведенных исследованиях по идентификации грибов методом MALDI-ToF MS, как и при идентификации бактерий, привлекают внимание разные способы пробоподготовки образца: с экстракцией белка и прямым нанесением культуры на мишень. Результаты MALDI-ToF MS анализа оценивались при непосредственном нанесении небольшого количества биомассы на мишень с добавлением матрицы [32]. Проанализированы 90 клинических штаммов дрожжевых грибов с использованием программного обеспечения MALDI BioType 3,0 и снижением порогового значения score (выше 1,7) для определения вида. Полученные результаты сравнивались с фенотипическими методами, а при несовпадении результатов проводилось определение последовательности 28S рРНК мини-секвенированием. 86 (95,6%) из 90 изолятов идентифицированы до рода, а 73/90 (81,1%) — до вида. В одном случае идентификация культуры грибов оказалась неверной, что затем было подтверждено секвенированием [32].

Проводилась идентификация 1192 изолятов дрожжевых грибов при помощи двух программ для масс-спектрометров (MALDI BioType и SARAMIS) и биохимических тестов [33]. Для 95,1% изолятов все три метода позволили правильно определить вид. Лучшая идентификация по сравнению с биохимическими методами близкородственных видов *Candida orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. parapsilosis* или *C. glabrata* и *C. bracarensis* отмечена с помощью MALDI-ToF MS [33].

MALDI-ToF MS для определения антибиотикорезистентности и штаммового типирования бактерий. Преимущества быстрой идентификации микроорганизмов методом MALDI-ToF MS анализа могут показаться весьма скромными, ведь он не избавляет от традиционных процедур определения антибиотикочувствительности, а протоколов, разработанных

с помощью этой технологии, пока еще нет. Возможность с помощью MALDI-ToF MS определить этиологический агент в минутах позволяет более точно подходить к назначению антибактериальной терапии, но и такая тактика может иметь нежелательные эффекты. Поэтому поиск новых способов быстрого определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам остается актуальным.

Применение метода MALDI-ToF MS анализа для определения антибиотикоустойчивости, а именно — маркеров резистентности, на сегодняшний день описано лишь в единичных работах некоторых исследователей, и пока не создано технологий его практического рутинного применения. Методом MALDI-ToF MS определяли карбапенемазную активность бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующих бактерий (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*) — посредством идентификации соединений карбапенемов и продуктов их распада [34]. Главным преимуществом этой технологии явилась возможность определения активности бактериальных ферментов в отношении конкретной группы антибиотиков, например, β -лактамов.

В сентябре 2011 г. появились сообщения о первых исследованиях по прямому обнаружению карбапенемаз методом MALDI-ToF MS [35, 36]. Анализ меропенема и продуктов его распада в данных исследованиях на MALDI-ToF MS возможен при использовании специальной подготовки образца. В первом случае исследование проводилось на 124 штаммах энтеро- и неферментирующих бактерий, из которых 30 являлись карбапенемаза-продуцирующими бактериями, 7 — продуцентами IMP и 2 — VIM-продуцирующими штаммами *P. aeruginosa*. Среди энтеробактерий один штамм являлся продуцентом VIM, два — KPC, один продуцировал NDM-1 [35]. Во втором случае для проверки наличия карбапенемаз, в том числе продуцентов NDM, KPC, VIM, OXA-48, OXA-162, были использованы 108 изолятов энтеробактерий (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens*) и 35 карбапенемаза-непродуцирующих штаммов [36]. Разработаны критерии интерпретации полученных масс-спектров продуктов деградации меропенема, позволяющие выделять карбапенемаза-положительные изоляты от карбапенемазаотрицательных [35, 36].

Прямая идентификация микроорганизмов в биоматериале методом MALDI-ToF MS. Значимым этапом на пути к «быстрой микробиологии» может стать идентификация микроорганизмов непосредственно в клинических образцах, которая в настоящее время становится все реальнее. Растет число исследований, посвященных изучению точности и применимости MALDI-ToF MS для индикации микроорганизмов в образцах клинического материала (моча, кровь и др.), минуя стадию культивирования [37—40].

Пока отсутствуют единые методики и стандарты использования метода MALDI-ToF MS для прямой идентификации микроорганизмов в моче, а полученные различными исследователями результаты не всегда сопоставимы. Наибольшая точность отмечена при наличии в пробе мочи монокультуры грамотрицательных бактерий и стафилококков в высоком титре [37, 39].

Серьезной проблемой при получении положительных результатов методом MALDI-ToF MS анализа непосредственно в клинических образцах является титр бактерий. Полученные отличия, возможно, связаны с применением разных методик пробоподготовки мочи — например, используются различные объемы и режимы центрифугирования [37, 39]. Дальнейшее усовершенствование методологии, вероятно, позволит повысить чувствительность анализа.

В диагностике инфекций кровотока культуральный метод остается пока «золотым стандартом», который обладает высокой чувствительностью, что может быть связано с оказанным влиянием на жизнеспособность микроорганизмов стар-

товой антимикробной терапии, назначаемой врачами при первых же клинических подозрениях на развитие сепсиса [38, 40]. Молекулярные методы диагностики совершили определенный прорыв в микробиологии, однако имеют ряд недостатков, и в первую очередь это ограниченный спектр разработанных зондов для детекции определенных микроорганизмов. В отличие от них метод MALDI-ToF MS анализа позволит за несколько минут выявить в одной пробе любой микроорганизм из более 4000 видов, имеющихся в базе данных. Возможность прямой MALDI-ToF MS идентификации в образцах крови во флаконах с положительным ростом культур может значительно сократить время индикации патогена и позволит быстрее произвести коррекцию антимикробной терапии [38, 40].

Сегодня отсутствуют стандартизованные протоколы пробоподготовки образцов из флаконов с положительной культурой крови для проведения MALDI-ToF MS, разные авторы предлагают различные способы обработки образца и режимы центрифугирования. При прямом анализе крови из флаконов с положительной культурой немалую отрицательную роль играет питательная среда, содержащая или не содержащая уголь и другие сорбенты [38]. Работы, выполненные с применением безугольных сред, демонстрируют более высокие показатели идентификации, нежели при пробоподготовке образцов из флаконов, содержащих среду с углем [38, 40]. Сложности интерпретации результатов связаны и с отсутствием в программе MALDI BioTuner рекомендаций по значениям достоверного score при идентификации гемокультур бактерий. Чтобы увеличить результативность метода, некоторыми исследователями принимаются данные с меньшими значениями score (менее 1,9). Предложено считать положительной видовой идентификацию со значением score 1,7 при условии идентичности 4 последовательных предположений биотипа [41]. Снижение порога идентификации бактерий по крайней мере до 1,7 для видовой идентификации может оказаться приемлемым подходом в деле увеличения чувствительности прямого MALDI-ToF MS анализа гемокультуры [38, 41].

MALDI-ToF MS — новые технологии для решения задач «быстрой микробиологии». Масс-спектрометрия может стать основным методом в будущем, так как это направление продолжает развиваться, а существующие базы данных микроорганизмов непрерывно пополняются. Учитывая скорость развития генетической изменчивости микроорганизмов — и в особенности устойчивости к антимикробным препаратам, — лаборатория микробиологии должна развиваться с еще большей скоростью, а внедрение новых инструментов идентификации микробов с повышенной точностью, скоростью и чувствительностью не должно ограничиваться научно-исследовательскими лабораториями или референс-центрами. В России метод MALDI-ToF MS анализа пока используется мало. Его внедрение в рутинную работу микробиологических лабораторий в ближайшее время неизбежно, а интеграция в уже существующие автоматизированные лабораторные системы радикально изменит порядок исследования, что приведет к повышению качества диагностики инфекционной патологии, сокращению сроков госпитализации больных, улучшению прогноза, снижению финансовых затрат как для пациента, так и для медицинского учреждения в целом.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—8, 10—16, 18—26, 29—36, 39—41 см. REFERENCES)

9. Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю. *Основы масс-спектрометрии белков и пептидов*. М.: Техносфера; 2012.
17. Кубанова А.А., Говорун В.М., Ильина Е.Н., Верещагин В.А., Фриго Н.В., Припутневич Т.В. Первый опыт применения метода

прямого белкового профилирования для идентификации и типирования *N. gonorrhoeae*. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2006; (5): 25—9.

27. Мелкумян А.Р., Припутневич Т.В., Анкирская А.С., Трофимов Д.Ю., Муравьева В.В., Муллабаева С.М. и др. Видовой состав лактобактерий при различном состоянии микробиоты влагалища у беременных. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013; 15(1): 72—9.
28. Мелкумян А.Р., Припутневич Т.В. Влагалищные лактобактерии — современные подходы к видовой идентификации и изучению их роли в микробном сообществе. *Акушерство и гинекология*. 2013; (7): 18—23.
37. Припутневич Т.В., Зайцева С.А., Завьялова М.Г., Мелкумян А.Р., Тетерина Т.А., Ильина Е.Н. и др. Сравнительный анализ применения масс-спектрометрии и автоматизированной проточной цитометрии для скрининга бактериурии. *Акушерство и гинекология*. 2013; (9): 53—8.
38. Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Бурменская О.В., Непша О.С., Никитина И.В., Любасовская Л.А. и др. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014; 16(1): 4—9.

REFERENCES

1. Wilkins C.L., Lao J.O. *Identification of Microorganism by Mass Spectrometry*. Hoboken: John Wiley and Sons Inc.; 2005.
2. Fenselau C., Anhalt J.P. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1975; 47: 219—25.
3. Hillenkamp F., Karas M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol.* 1990; 193: 280—95.
4. Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(3): 547—603.
5. Reich M., Bosshard P.P., Stark M., Beyser K., Borgmann S. Species identification of bacteria and fungi from solid and liquid culture media by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Bacteriol. Parasitol.* 2013; 5: 4—8.
6. Илина Е.Н. Direct Matrix — Assisted Laser Desorption-Ionisation (MALDI) Mass-Spectrometry bacteria profiling for identifying and characterizing pathogens. *Acta Naturae.* 2009; 1(1): 115—20.
7. Lay O.J. MALDI-TOF spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom. Rev.* 2001; 20: 172—94.
8. El-Bouri K., Johnston S., Rees E., Thomas I., Bome-Mannathoko N., Jones C. et al. Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications. *Br. J. Biomed. Sci.* 2012; 69(2): 47—55.
9. Lebedev A.T., Artemenko K.A., Samgina T.Yu. Bases Mass Spectrometry of Proteins and Peptides [Osnovy mass-spektrometrii belkov i peptidov]. Moscow: Tekhnosfera; 2012. (in Russian)
10. Yen-Peng H., Muralidhar Reddy P. Identification of pathogens by mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2010; 56(4): 525—36.
11. Afonso C., Fenselau C. Use of bioactive glass slides for matrix-assisted laser desorption/ionization analysis: application to microorganisms. *Anal. Chem.* 2003; 75: 694—7.
12. Ishida Y., Kitagawa K., Nakayama A., Ohtani H. Complementary analysis of lipids in whole bacteria cells by thermally assisted hydrolysis and methylation — GC and MALDI-MS combined with on-probe sample pretreatment. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 2006; 77: 116—20.
13. Lancashire L., Schmid O., Shah H., Ball G. Classification of bacterial species from proteomic data using combinatorial approaches incorporating artificial neural networks, cluster analysis and principal components analysis. *Bioinformatics.* 2005; 21(10): 2191—9.
14. Schmid O., Ball G., Lancashire L., Culak R., Shah H. New approaches to identification of bacterial pathogens by surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry in concert with artificial neural networks, with special reference to *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Med. Microbiol.* 2005; 54(12): 1205—11.
15. Alatoon A., Cunningham S.A., Ihde S.M., Mandrekar J., Patel R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(8): 868—73.
16. TeKippe M.E., Shuey S., Winkler D.W., Butler M.A., Burnham C.A. Optimizing identification of clinically relevant gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight mass spectrometry system. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51: 1421—7.
17. Kubanova A.A., Govorun V.M., Il'ina E.N., Vereshchagin V.A., Frigo N.V., Pripitnevich T.V. The first experience with the use of the direct protein profiling method to identify and type *N. gonorrhoeae*. *Vestnik dermatologii i venerologii.* 2006; (5): 25—9. (in Russian)
18. Saffert R.T., Cunningham S.A., Ihde S.M., Jobe K.E., Mandrekar J., Patel R. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(3): 887—92.
19. Ford B.A., Burnham C.A. Optimization of routine identification of clinically relevant gram-negative bacteria by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Bruker Biotyper. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(5): 1412—20.
20. Degand N., Carbonnelle E., Dauphin B., Beretti J.L., Le Bourgeois M., Sermet-Gaudelus I. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(10): 3361—7.
21. Ruf S., Breitung K., Schellenberger W., Merte K., Kneist S., Eschrich K. Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Oral Microbiol. Immunol.* 2005; 20(5): 267—73.
22. Friedrichs C., Rodloff A.C., Chhatwal G.S., Schellenberger W., Eschrich K. Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(8): 2392—7.
23. Wessels E., Schelfaut J.J., Bernards A.T., Claas E.C. Evaluation of several biochemical and molecular techniques for identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pseudopneumoniae* and their detection in respiratory samples. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(4): 1171—7.
24. Werno A.M., Christner M., Anderson T.P., Murdoch D.R. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from non-pneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* group by matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(9): 2863—7.
25. Ikryannikova L.N., Filimonova A., Malakhova M., Savinova T., Filimonova O., Ilina E.N. et al. Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 19(11): 1066—71.
26. Shah H.N., Keys C.J., Schmid O., Gharbia S.E. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology. *Oxford Journals. Medicine. Clin. Infect. Dis.* 2002; 35(1): 558—64.
27. Melkumyan A.R., Pripitnevich T.V., Ankiorskaya A.S., Trofimov D.Yu., Murav'eva V.V., Mullabaeva S.M. et al. Lactobacilli species diversity in different states of vaginal microbiota in pregnant women. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2013; 15(1): 72—9. (in Russian)
28. Melkumyan A.R., Pripitnevich T.V. Vaginal Lactobacilli: current approaches to species identification and to the study of their role in the microbial community. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2013; (7): 18—23. (in Russian)
29. Callaway A., Kostrzewa M., Willershausen B., Schmidt F., Thiede B., Küpper H. et al. Identification of Lactobacilli from deep carious lesions by means of species-specific PCR and MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin. Lab.* 2013; 59(11—12): 1373—9.
30. Nagy E., Maier G., Urbán E., Terhes G., Kostrzewa M.; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Species identification of clinical isolates of bacteroides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 15(8): 796—802.
31. Marklein G., Josten M., Klanke U., Müller E., Horré R., Maier T. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(9): 2912—7.
32. Theel E.S., Schmitt B.H., Hall L., Cunningham S.A., Walchak R.C., Patel R. et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(9): 93—5.
33. Bader O., Weig M., Taverne-Ghadwal L., Lugert R., Gross U., Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17(9): 1359—65.
34. Jung J., Popp C., Sparbier K., Lange C., Kostrzewa M., Schubert S. Evaluation of MALDI-TOF-MS for rapid detection of β -lactam resistance in Enterobacteriaceae derived from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(3): 924—30.

35. Hrabak J., Walkova R., Studentova V., Chudácková E., Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49 (9): 3222—7.
36. Hrabak J., Studentova V., Walkova R., Zemlicková H., Jakubu V., Chudácková E. et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(7): 2441—3.
37. Priputnevich T.V., Zaytseva S.A., Zav'yalova M.G., Melkumyan A.R., Teterina T.A., Il'ina E.N. et al. Comparative analysis of the use of mass spectrometry and automated flow cytometry to screen for bacteriuria. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2013; (9): 53—8. (in Russian)
38. Priputnevich T.V., Melkumyan A.R., Burmenskaya O.V., Nepsha O.S., Nikitina I.V., Lyubasovskaya L.A. et al. Use of MALDI-TOF mass-spectrometry and quantitative PCR for rapid diagnosis of sepsis. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2014; 16(1): 4—9. (in Russian)
39. Wang X.N., Zhang G., Fan Y.Y., Yang X., Sui W.J., Lu X.X. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *J. Microbiol. Methods.* 2013; 92(3): 231—5.
40. Chen J.H., Ho P.L., Kwan G.S., She K.K., Siu G.K., Cheng V.C. et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures using two commercial MALDI-TOF mass-spectrometry systems. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(6): 1733—9.
41. Moussaoui W., Jaulhac B., Hoffmann A.M., Ludes B., Kostrzewa M., Riegel P. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16(11): 1631—8.

Поступила 04.05.16

Принята к печати 15.05.2016

Редакционный комментарий к статье ПРИПУТНЕВИЧ Т.В., МЕЛКУМЯН А.Р. «МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ — НОВОЕ СЛОВО В КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ»

Бурное развитие МС-технологий, их внедрение в медицинскую микробиологию повлекло за собой значительные изменения в микробиологической диагностике. Внедрение масс-спектрометрии носит глобальный характер — только в Европе в микробиологических лабораториях работают свыше тысячи MALDI-ToFMS систем, и их количество постоянно увеличивается. Основным достижением МС-технологий является быстрая и надежная идентификация большинства клинически значимых видов микроорганизмов не только в чистой культуре, но и в мономикробном анализе.

Возможности идентификации клинических изолятов зависят от технических параметров масс-спектрометров, свойств изучаемого объекта, пробоподготовки, биоинформационного обеспечения. Даже при использовании приборов с хорошими техническими показателями требуется пробоподготовка, направленная на выделение и концентрацию диагностически значимых компонентов изучаемого образца, которые правильно отражают таксономическое положение возбудителя. Для получения корректных результатов MALDI-ToF MS исключительно важна матрица, которая обеспечивает получение специфических для анализа спектральных характеристик, т. е. его «узнаваемость». Выбор матрицы обусловлен типом анализируемого вещества. Пакеты программ, поддерживающие работу масс-спектрометров, обеспечивают статистическую обработку полученных спектров и их сравнение с референсными спектрами известных микроорганизмов.

Главные проблемы масс-спектрометрии связаны с трудностями идентификации микроорганизмов в смешанных культурах (включая биологический материал); сложностями МС-определения представителей отдельных таксономических групп, которые получили название «трудно идентифицируемые таксоны», например представители рода *Nocardia*, рода *Kocuria*, мицелиальные грибы, поскольку коммерческие базы данных, обеспечивающие работу масс-спектрометров, медленно пополняются спектрами данных микроорганизмов, что и служит причиной ошибок идентификации; со сложностью в идентификации близкородственных микроорганизмов, таких как *E. coli* и *Shigella spp.*, пневмококки и зеленящие стрептококки; с отсутствием стандартных критериев масс-спектрометрической оценки резистентности микроорганизмов, аналогичных брейкпойнтам Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам (EUCAST) и Института клинических и лабораторных стандартов США (CLSI). Коммерческие пакеты программ, поддерживающие работу масс-спектрометров, не содержат баз данных по целому ряду патогенов, например по возбудителям ООИ. В связи с этим отечественными учеными и специалистами при подготовке к зимней Олимпиаде в Сочи были разработаны и апробированы такие базы данных, о чем мы сообщали на страницах нашего журнала. Коммерческие пакеты программ нуждаются в дальнейшем серьезном пополнении баз данных по грамположительным палочкам и грибам и ряду других микроорганизмов.

Прогресс в развитии прикладных масс-спектрометрических технологий дает надежду на то, что указанные проблемы будут решены в течение ближайших лет.

Следует понимать, что MALDI-ToF масс-спектрометрия не является панацеей и не может решить все стоящие перед врачом-бактериологом задачи. Применение методов молекулярной диагностики, в том числе и MALDI-ToF MS, в клинической микробиологии оправдано в тех случаях, когда классические микробиологические методы оказываются несостоятельны или занимают слишком много времени.

Зам. главного редактора журнала проф. А.Ю. Миронов (Москва)