



Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

www.iacsmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273)
Тираж 3000 экз.

Подписные индексы

По каталогу «Журналы России» на 2020 г. агентства «Роспечать»:

82125 – для индивидуальных подписчиков;

82126 – для организаций.

Подписка на сайте издателя

<https://service.iacsmac.ru>

Адрес для корреспонденции

214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
cmac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:
www.cmac-journal.ru

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук. Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2020.

Содержание

Болезни и возбудители

- Колбин А.С.
164 Лечение COVID-19 антималярийными средствами с клинико-фармакологических позиций
Кулабухов В.В., Шабанов А.К., Андреева И.В., Стецюк О.У., Андреев В.А.
175 Биомаркеры инфекции в оптимизации антибактериальной терапии: оправданные ожидания
Попов Д.А.
189 Нерешенные вопросы антибиотикотерапии инфекций, вызванных золотистыми стафилококками

Антимикробные препараты

- Веселов А.В.
197 Современное место эхинокандинов в терапии и профилактике инвазивных микозов: краткий обзор
Бонцевич Р.А., Адонина А.В., Гаврилова А.А., Батищева Г.А., Черенкова О.В., Гончарова Н.Ю., Биккинина Г.М., Барышева В.О., Кетова Г.Г., Бочанова Е.Н., Даулетбеков Н.Д., Тилекеева У.М.
212 Оценка уровня знаний студентов старших курсов медицинских вузов по вопросам рационального применения антимикробных препаратов в клинической практике: результаты проекта «KANT»

Опыт работы

- Гордеева С.А., Золотарёв А.Ю., Мовсисян М.Г., Розинко А.В.
221 Опыт практического применения микробиологического анализатора BactoSCREEN в работе лаборатории клинической микробиологии
Самойлова А.А., Краева Л.А., Лихачев И.В., Рогачева Е.В., Вербов В.Н., Михайлов Н.В., Зуева Е.В.
231 Апробация отечественного набора «МПК-МИКРО», предназначенного для определения антибиотикоустойчивости микроорганизмов методом серийных микроразведений
Иванцов В.А., Богданович И.П., Лашковский В.В., Аносов В.С.
237 Клинические и микробиологические характеристики перипротезной инфекции тазобедренного и коленного суставов
Зырянов С.К., Ченкуров М.С., Ивжиц М.А., Батечко Ю.А., Иванова Е.Б., Якунина М.А.
242 Исследование структуры сопутствующих заболеваний и этиологии внебольничной пневмонии у пациентов пожилого и старческого возраста

Опыт практического применения микробиологического анализатора VactoSCREEN в работе лаборатории клинической микробиологии

Гордеева С.А., Золотарёв А.Ю., Мовсисян М.Г., Розинко А.В.

Городская поликлиника №107, Санкт-Петербург, Россия

Контактный адрес:
Светлана Александровна Гордеева
Эл. почта: svetalgor@mail.ru

Ключевые слова: идентификация, MALDI-MS, эффективность.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Оценка эффективности практического применения идентификации микроорганизмов методом MALDI-MS на микробиологическом анализаторе VactoSCREEN в работе лаборатории клинической микробиологии.

Материалы и методы. Бактериологическое исследование проводили путем посева на колумбийский агар с добавлением 5% овечьей крови (37°C, 24 ч.). Колонии для идентификации отбирали по характеру роста, типу гемолиза, морфологии и консистенции. Видовую идентификацию проводили методом MALDI-MS на микробиологическом анализаторе VactoSCREEN. При необходимости выделенные культуры идентифицировали по морфологическим и биохимическим свойствам до вида, а также по серологическим свойствам – до уровня сероваров и биоваров.

Результаты. За 2018 г. проведено 85945 исследований. В сравнении с 2017 г. количество выполняемых исследований увеличилось в 10 раз. За обозначенный период выделено 23252 микроорганизма. Затраты времени на проведение одной идентификации составили от 2,98 до 13,22 мин., включая время на вспомогательные процедуры. Время идентификации одной культуры на самом бактериологическом анализаторе VactoSCREEN составляет в среднем 1,55 мин. Снижение трудозатрат при использовании масс-спектрометрии в сравнении с ручными методами идентификации составило в среднем 3,5 раза. Годовая экономия трудозатрат в пересчете на штатные единицы соответствует 11 штатным единицам.

Выводы. Учитывая высокую производительность, скорость анализа, простоту и низкую стоимость пробоподготовки, идентификация методом MALDI-MS хорошо вписывается в алгоритм функционирования микробиологических лабораторий, особенно при необходимости масштабных скрининговых исследований первичных посевов. Наиболее перспективным является внедрение технологии MALDI-MS в систему микробиологического мониторинга, который традиционно связан с большими объемами исследуемого материала и необходимостью широкого спектра скрининговых исследований.

Original Article

Experience with the use of microbiological analyzer VactoSCREEN in a routine practice of clinical microbiology laboratory

Gordeeva S.A., Zolotarev A.Yu., Movsisyan M.G., Rozinko A.V.

City outpatient clinic #107, Saint-Petersburg, Russia

Contacts:
Svetlana A. Gordeeva
E-mail: svetalgor@mail.ru

Key words: identification, MALDI-MS, efficiency.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. Assessment of bacterial identification effectiveness in clinical microbiology laboratory using the MALDI-MS based system VactoSCREEN.

Materials and methods. Bacteriological testing was done by the cultivation on Columbia agar with 5% of sheep blood (at 37°C for 24 hours). Colonies for identification were selected based on their growth pattern, type of hemolysis, morphology and consistency. The species identification was done by the MALDI-MS using the microbiology analyzer VactoSCREEN. Apart from MALDI-MS, we used morphology and biochemical methods for species identification when necessary. Serological tests were used for serovar and biovar identifications.

Results. A total of 85945 bacterial identifications was performed in 2018. When compared to 2017, the throughput of the laboratory increased ten times. A total of 23252 isolates were obtained in the previously mentioned period. A single identification took 2.98–13.22 minutes including time for supporting procedures, whereas the staff time for one identification itself constituted an average of 1.55 minutes. When compared to manual methods, introduction of mass-spectrometry allowed us to achieve 3.5-fold decrease of the staff time in the average. Therefore, annual labor saving in terms of staffing corresponds to 11 full-time positions.

Conclusions. In view of high throughput, analysis speed, simplicity and low cost of sample preparation, MALDI-MS identification fits well into the practice of clinical microbiology laboratory, especially when large-scale screening studies of bacterial cultures are required. The use of MALDI-MS is likely to be most promising when carrying out microbiological monitoring that is traditionally associated with large number of samples and wide range of microorganisms detected.

Введение

В последние годы одним из наиболее активно развивающихся направлений в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний является технология времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией-ионизацией (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry – MALDI-MS) [1]. Для исследования микроорганизмов MALDI-MS впервые была применена сравнительно давно, в середине 1970-х гг., однако активное внедрение этого метода в практику лабораторной диагностики началось в последнее десятилетие. Это обусловлено накоплением фактического материала для создания баз данных и совершенствованием технологии масс-спектрометрического анализа для идентификации микроорганизмов. MALDI-MS – вариант масс-спектрометрии, основанный на «мягкой» ионизации под действием лазерного излучения, позволяющий анализировать молекулы с большой молекулярной массой, в частности молекулы белков, не разрушая их [1]. С помощью метода можно анализировать совокупность белков микробной клетки, получая с высокой точностью и разрешением уникальные для данного вида микроорганизма масс-спектры. Идентификация микроорганизмов с использованием MALDI-MS осуществляется путем сравнения белкового спектра исследуемого штамма с базовой коллекцией референтных спектров микроорганизмов известных видов. На основании степени соответствия спектров определяется принадлежность исследуемого микроорганизма к определенному виду (роду) [2–4].

Процедура выполнения MALDI-MS достаточно проста, не требует существенных временных затрат и специальных навыков персонала. Для исследования необходима единичная изолированная колония, отобранная с агара. Далее возможно нанесение на специальную металлическую подложку – плашку/мишень либо единичной изолированной колонии без дополнительной обработки, либо экстракта, полученного после предварительной обработки суспензии исследуемого изолята [3–5]. В последние годы разрабатывается ряд подходов, позволяющих проводить прямую идентификацию возбудителя в некоторых видах клинического материала, таких как моча и спинномозговая жидкость, а также в положительных гемокультурах [6–11].

Многочисленные работы и постоянно накапливаемый опыт практического применения демонстрируют высокую эффективность метода MALDI-MS-идентификации для определения таксономической принадлежности микроорганизмов разных видов [2, 4, 5, 12]. Универсальность платформы MALDI-MS позволяет не только идентифицировать микроорганизм, но и определять иные его свойства, например, устойчивость к антимикробным препаратам [13]. К недостаткам и ограничениям методики можно отнести высокую стоимость оборудования, сложность проведения идентификации и межвидовой дифференциации некоторых групп генетически близкородственных микроорганизмов, связанную со сходством их масс-спектрометрических про-

филей, низким качеством спектров из-за устойчивости отдельных объектов к обработке реагентами по стандартным протоколам пробоподготовки, отсутствием референтных спектров в базе данных.

До недавнего времени для идентификации микроорганизмов широко использовались импортные коммерческие MALDI-MS платформы: Vitek-MS (bioMérieux, Франция) и BioTyper (Bruker Daltonics, Германия), для каждой из которых была создана собственная идентификационная база, разработан алгоритм идентификации и пробоподготовки [3, 4, 14].

В настоящее время появилась первая отечественная система масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов и определения их чувствительности к антибиотикам – микробиологический анализатор VactoSCREEN производства НПФ «Литех» на базе времяпролетного масс-спектрометра LaserToF LT2 Plus производства компании Scientific Analysis Instruments (Великобритания), зарегистрированная Росздравнадзором в 2016 г.

С января 2018 г. прибор используется в ГБУЗ «Городская поликлиника №107» Санкт-Петербурга, где создана современная микробиологическая лаборатория. Кадровый состав, подготовка специалистов, наличие оборудования соответствуют задачам по обеспечению населения всеми видами бактериологических исследований. Лаборатория выполняет микробиологические исследования для 18 медицинских организаций, что с филиалами составляет около 100 пунктов сбора биоматериала.

В лаборатории установлена и успешно функционирует лабораторная информационная система (ЛИС) qMS, позволяющая автоматизировать процесс ввода и получения данных, а также передачу результатов анализов в режиме реального времени в медицинскую информационную систему (МИС). Микробиологический анализатор VactoSCREEN для идентификации микроорганизмов на основе MALDI-MS интегрирован в ЛИС qMS, что дает возможность автоматически передавать задания на анализатор и переносить результаты идентификаций в рабочие журналы ЛИС.

Актуальность исследования обусловлена стремительным развитием технологий, которые приходят в здравоохранение, и повышением требований, предъявляемых к результатам микробиологических исследований. Для своевременного назначения адекватной терапии необходима точная и быстрая видовая диагностика, выявление механизмов резистентности и микробиологический мониторинг в реальном времени. Кроме того, все больше микробиологических лабораторий становятся централизованными, а значит должны выполнять большие объемы исследований. Использование метода MALDI-MS позволяет решать эти задачи.

Цель данной работы – оценка эффективности практического применения идентификации микроорганизмов методом MALDI-MS на микробиологическом анализаторе VactoSCREEN в работе лаборатории клинической микробиологии.

Материалы и методы

Культивирование бактерий

Культивирование бактерий для идентификации на масс-спектрометре проводили с использованием различных питательных сред. Применялись дифференциально-диагностические среды для первичного посева и накопления микроорганизмов: колумбийский агар с 5% дефибрированной овечьей кровью, колумбийский агар с 5% дефибрированной овечьей кровью и добавлением налидиксовой кислоты (15 мг/л готовой среды), шоколадный агар, маннитол-солевой агар, агар МакКонки, SS-агар, агар Шедлера, агар Сабуро, хромогенный агар для обнаружения уropатогенных бактерий, хромогенный агар для первичной идентификации дрожжеподобных грибов рода *Candida*, коринебакагар и другие. В течение года закупались питательные среды разных производителей: ФБУН «ГНЦ ПМБ» (Россия); ООО «Биомедиа» (Россия); Bio-Rad (Франция); ЗАО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии» (Россия); Pronadisa (Испания).

Использовали как готовые питательные среды, так и среды собственного производства. В последнем случае питательные среды приготавливали и разливали с помощью автоматической станции «ProfiClave PC10» с разливочным модулем фирмы Biotool (Швейцария), обеспечивающей производительность до 350 чашек в час.

Культивирование проводили в разных условиях (аэробных, анаэробных, микроаэрофильных) и при разных температурах (37°C, 30°C, 41°C, 35°C – для определения чувствительности к антимикробным препаратам) в соответствии с требованиями к росту микроорганизмов. Длительность культивирования продолжалась 18–24–48 ч.

При оценке результата первичного посева использовали критерии диагностической значимости выделенных микроорганизмов. Отбор колоний для идентификации проводили по характеру роста, типу гемолиза, морфологии и консистенции колоний.

Для оптимального отслеживания образца при идентификации на масс-спектрометре использовали штрих-код, который содержит идентификационную информацию образца и соответствующую позицию анализируемого образца на плашке/мишени MALDI-MS-анализатора.

Пробоподготовка образцов для MALDI-MS анализа

Существуют **3 стандартных метода пробоподготовки** клинических изолятов микроорганизмов для нанесения на ячейку плашки/мишени:

1. Метод прямого нанесения.
2. Метод с муравьиной кислотой на плашке.
3. Метод белковой экстракции с муравьиной кислотой.

Для идентификации на масс-спектрометре нами обычно использовался простой и быстрый **метод прямого нанесения** биологического материала. Единичную колонию свежей культуры наносили в ячейку плашки/мишени прибора и равномерно распределяли по ней, затем высушивали при комнатной температуре в течение нескольких минут. После высыхания на образец наносили 1 мкл раствора матрицы (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в водном растворе 2,5%

трифторуксусной кислоты и 50% ацетонитрила), затем высушивали при комнатной температуре в течение нескольких минут.

Для повышения эффективности масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов, обладающих полисахаридной капсулой, иногда может потребоваться применение **метода с муравьиной кислотой на плашке**. При наличии достаточного количества микроорганизмов в ячейке качество отснятых спектров зависит от эффективности лизиса клеточной стенки. Для усиления экстракции белков на бактериальную массу, помещенную в ячейку плашки/мишени, наносили 1 мкл 70% муравьиной кислоты, подсушивали при комнатной температуре, затем наносили 1 мкл раствора матрицы, высушивали при комнатной температуре и проводили анализ.

Метод белковой экстракции с муравьиной кислотой используется при проблемной идентификации близкородственных микроорганизмов *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus mitis* группы, актиномицетов, бактерий рода *Clostridium* и грамположительных анаэробных кокков, а также при идентификации мицелиальных грибов. В этом случае обработку бактериальной массы проводили по следующему протоколу. В пробирку типа Eppendorf, содержащую 300 мкл деионизированной воды, вносили одноразовую петлей на 1 мкл колонию (в случае использования материала первичного посева) или несколько колоний (в случае использования чистой культуры) и тщательно перемешивали. Затем добавляли 900 мкл 96% этилового спирта, снова перемешивали и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 2 мин. С помощью пипетки отбирали супернатант. Осаждали капли со стенок пробирок на вортексе и отбирали оставшуюся жидкость пипеткой. К осадку добавляли 70% муравьиную кислоту (добавляемый объем зависел от количества биоматериала). В случае единичной крупной колонии – до 15 мкл. Перемешивали на вортексе. Добавляли объем ацетонитрила, равный объему внесенной муравьиной кислоты. Центрифугировали при 12000 об/мин в течение 2 мин. На ячейку плашки/мишени наносили 1 мкл супернатанта. Высушивали на воздухе в течение 1–2 мин. После высыхания образца наносили 1 мкл раствора матрицы. Высушивали на воздухе в течение 1–2 мин. После высыхания матрицы проводили измерения на анализаторе.

Метод белковой экстракции с муравьиной кислотой значительно повышает эффективность идентификации: до рода – с 56% при прямом нанесении до 96% при белковой экстракции с муравьиной кислотой; до вида – с 20% до 69% соответственно [15]. Однако он является трудозатратным и занимает много времени, что осложняет использование данного метода в ежедневной клинической практике при большом потоке образцов.

Таким образом, если прямое нанесение не позволяет идентифицировать микроорганизм с высокой степенью достоверности, то необходимо воспользоваться пробоподготовкой с дополнительной экстракцией 70% муравьиной кислотой на плашке или провести белковую экстракцию с 70% муравьиной кислотой.

После нанесения колонии микроорганизмов на ячейку плашки/мишени и высыхания наносили 1 мкл

раствора матрицы. Матрица – органическое вещество, необходимое для эффективной ионизации белков образца. Для приготовления матричного раствора для идентификации микроорганизмов на анализаторе VastoSCREEN использовали α -циано-4-гидроксикоричную кислоту в водном растворе 2,5% трифторуксусной кислоты и 50% ацетонитрила в конечной концентрации 10 мг/мл. Свежий матричный раствор готовили ежедневно или чаще по мере необходимости.

Контроль качества MALDI-MS-идентификации в рутинной практике проводили следующими контрольными штаммами микроорганизмов: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Corynebacterium diphtheriae* токсигенный штамм биовара *gravis* N665, *Corynebacterium diphtheriae* нетоксигенный штамм биовара *mitis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Candida albicans* ATCC 10231, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 и др.

MALDI-MS-анализ

Масс-спектры снимали в линейном режиме на микробиологическом анализаторе VastoSCREEN (ООО НПФ «ЛИТЕХ») в выбранном диапазоне m/z от 3000 до 18000 с количеством одиночных спектров для снятия спектра с лунки, равным 200. Версия базы данных анализатора VastoSCREEN 2.3 позволяет идентифицировать 1970 видов микроорганизмов (по состоянию на март 2018 г.).

Анализ спектров проводили с помощью программы VastoSCREEN-ID. Используемый для идентификации микроорганизмов масс-спектрометрический анализ белков требует регулярного проведения калибровки. В качестве бактериального стандарта, обеспечивающего надежность идентификации, для калибровки применяли бактериальный стандарт производства ООО НПФ «ЛИТЕХ» на основе рибосомных белков лабораторного штамма *Escherichia coli* DH5 α .

Для повышения эффективности идентификации методом MALDI-MS можно продублировать нанесение пробы (колоний) на несколько ячеек плашки/мишени.

О таксономической принадлежности судили по числовому значению коэффициента достоверности идентификации: идентификация до вида – 0,8–1,0 (зеленый цвет ячейки на схеме плашки/мишени); идентификация до рода – 0,5–0,79 (желтый цвет); отсутствие идентификации – < 0,5 (красный цвет).

Результаты идентификации сохраняли в архиве. Результаты с высоким коэффициентом достоверности идентификации (> 0,5) выгружали в ЛИС, после чего их валидировал врач-бактериолог. Только после этого результат анализа передавали в МИС, и он становился доступным для лечащего врача.

Для постановки диагноза при низком значении коэффициента достоверности идентификации (< 0,5) необходимо использовать результаты других методов исследования и учитывать клинические проявления инфекции.

Использованные в работе морфологические, биохимические, ПЦР, серологические методы идентификации микроорганизмов. Помимо идентификации с помощью MALDI-MS при необходимости проводилась идентификация выделенных микроорганизмов до вида по морфологическим и биохимическим свойствам, а также по серологическим свойствам – до уровня сероваров и биоваров. Дополнительных методов идентификации требуют представители *Burkholderia cepacia* complex, *Citrobacter freundii* complex, *Enterobacter cloacae* complex и др. Для дополнительной внутривидовой диагностики стафилококков, стрептококков, энтерококков, энтеробактерий, неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) использовали готовые диагностические тест-системы (ERBA Lachema, Чехия), для межродовой и видовой дифференциации энтеробактерий – системы индикаторные бумажные (НПО ФБУП «Микроген», Россия). При подозрении на *Corynebacterium diphtheriae* проводили биохимическое тестирование на ферментацию глюкозы, сахарозы, крахмала, мальтозы, фруктозы, галактозы, тест на нитраты, определение уреазной активности, определение цистиназной активности, тест на токсигенность с использованием набора реагентов для дифференциации микроорганизмов рода *Corynebacterium* до вида и определения токсигенных свойств – ДС-Диф-Корине (ООО НПО «Диагностические системы», Россия). При подозрении на возбудителей кишечных инфекций производили отколы на трехсахарный агар, использовали оксидазный тест, тест на подвижность, на индол (среда Кларка с метиленовым красным), мочевины (бульон Кристенсена). С диагностической целью применяли иммунохроматографические тесты для выявления ротавируса (RIDA QUICK Rotavirus, Германия), диагностический экспресс-тест для качественного определения антигенов *Campylobacter* «One step assay» (Novamed Ltd, Израиль), диагностикумы для выявления стрептококков групп А, В, С, G, диагностикум для выявления *S. aureus* (СТРЕП-тест, СТАФ-тест, НПО «Аквапаст», Россия). При подозрении на патогенные микроорганизмы применяли агглютинацию диагностическими сыворотками для серодиагностики *Salmonella* spp., *Shigella* spp., патогенных *E. coli*, *Neisseria meningitidis* и др. Особое значение имеет определение антигенных свойств для дифференциальной диагностики патогенных *E. coli* и *Shigella* spp., которые пока невозможно различить по белковым спектрам из-за близкого генетического сходства. Для дифференциальной диагностики близких родственных микроорганизмов *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis* группы и *Streptococcus* spp. использовали фенотипические методы определения чувствительности к оптохину и лизис в присутствии солей желчи, определение антигенных свойств, тест с бацитрацином, PYR-тест. При подозрении на выделение *Neisseria gonorrhoeae* проводили проверку идентификации на амплификаторе Rotor-Gene Q с использованием набора реагентов для выявления ДНК *Neisseria gonorrhoeae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *Neisseria gonorrhoeae*-тест-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия).

Результаты

За 2018 г. проведено 85945 исследований. Если в январе 2018 г. объем выполненных исследований составлял 4820 проб, то к концу года нагрузка выросла в 2 раза и составляла 9900 проб в месяц, а в сравнении с 2017 г. количество выполняемых исследований увеличилось в 10 раз. За указанный период выделено 23252 микроорганизма. С диагностической целью проведено 45304 идентификаций с учетом дублей и количества питательных сред, с которых производился отбор культур (Таблица 1).

Таблица 1. Количество идентификаций, выполненных в МЦКДЛ ГБУЗ «Городская поликлиника №107» Санкт-Петербурга методом MALDI-MS в 2018 г.

Период (месяц 2018 г.)	Количество идентификаций
январь	2747
февраль	3215
март	4100
апрель	5282
май	4044
июнь	3710
июль	3478
август	4005
сентябрь	2960
октябрь	3626
ноябрь	4296
декабрь	3841
ИТОГО за 2018 г.	45304

Таблица 2. Динамика изменений качества идентификации на протяжении 2018 г.

Месяц (2018 г.)	Идентификация до вида, %	Идентификация до рода, %	Не идентифицировано, %	Отсутствие спектра, %	ИТОГО, %
январь	52,35	13,07	25,99	8,59	100
февраль	60,62	12,76	15,55	11,07	100
март	54,51	13,81	27,02	4,66	100
апрель	42,31	15,75	34,65	7,29	100
май	57,99	8,41	28,73	4,87	100
июнь	59,17	8,11	27,68	5,04	100
июль	70,73	5,38	21,62	2,27	100
август	76,30	4,35	15,16	4,19	100
сентябрь	87,70	2,34	7,70	2,26	100
октябрь	98,32	1,00	0,37	0,31	100
ноябрь	97,01	0,68	1,23	1,08	100
декабрь	99,24	0,39	0,29	0,08	100

Таблица 3. Динамика изменения соотношения количества идентификаций до вида и до рода в 2018 г. на микробиологическом анализаторе VactoSCREEN

Период (квартал 2018 г.)	Количество идентификаций				Всего
	до вида	% до вида	до рода	% до рода	
I квартал	5622	55,9	1335	13,3	10062
II квартал	6775	52,0	1473	11,3	13036
III квартал	8112	77,7	430	4,1	10443
IV квартал	11444	97,3	111	0,9	11763
ИТОГО за 2018 г.	31953	70,53	3349	7,39	45304

Гордеева С.А. и соавт.

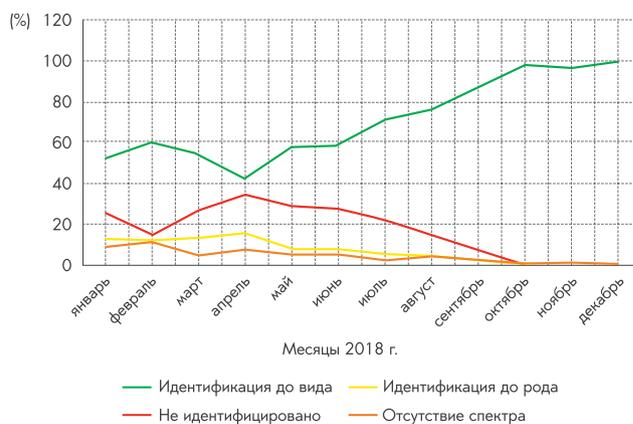


Рисунок 1. Динамика изменений качества идентификации в течение 2018 г.

Освоение нового высокотехнологичного метода исследования потребовало времени. В течение года по мере накопления опыта работы на микробиологическом анализаторе VactoSCREEN повышалось качество идентификации микроорганизмов (Рисунок 1, Таблица 2). Также отмечена положительная динамика повышения качества идентификации микроорганизмов до вида (Таблица 3).

Всего за 2018 г. методом MALDI-MS идентифицировано 45304 микроорганизма (158 видов). Наиболее часто выделялись представители порядка Enterobacterales (Рисунок 2) – 18810 микроорганизмов (более 40 видов).

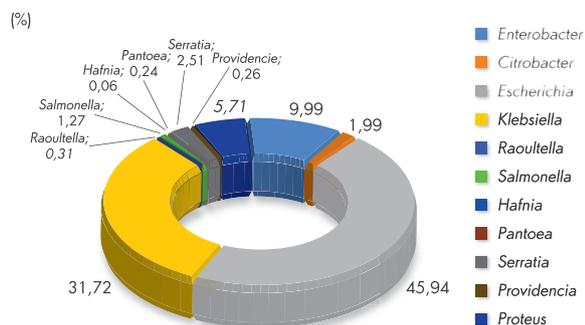


Рисунок 2. Встречаемость представителей родов порядка Enterobacteriales, %

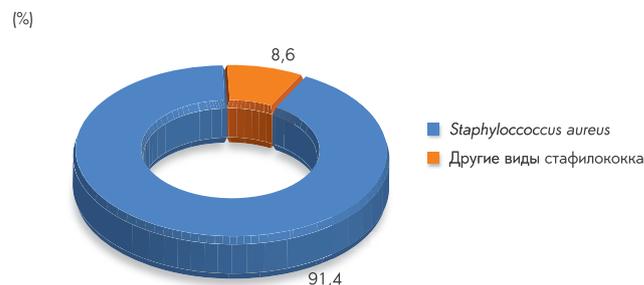


Рисунок 3. Преобладающая встречаемость *Staphylococcus aureus* на фоне других видов стафилококка, %

Среди них – представители семейства Enterobacteriaceae (типового рода *Enterobacter* – 1 879 (7 видов), рода *Citrobacter* – 374 (6 видов), рода *Escherichia* – 8642 (*Escherichia coli*), рода *Klebsiella* – 5967 (4 вида), рода *Raoultella* – 58 (3 вида), рода *Salmonella* – 238 (идентификация до рода с последующим серотипированием и биохимической идентификацией до вида)); представители семейства Hafniaceae – 12 (1 вид *Hafnia alvei*); представители семейства Erwiniaceae (рода *Pantoea* – 45 (2 вида)); представители семейства Yersiniaceae (рода *Serratia* – 473 (5 видов)); представители семейства Morganellaceae (рода *Providencia* – 48 (3 вида) и рода *Proteus* – 1074 (3 вида)).

Представителей рода *Staphylococcus* (Рисунок 3) было выделено 11422 (12 видов). Методом MALDI-MS наиболее часто идентифицировался *Staphylococcus aureus* – 10441 (91,4%). Стафилококки, не имеющие этиологического значения, методом масс-спектрометрии не исследовались.

Представителей рода *Streptococcus* было выделено 5210 (18 видов), в том числе *Streptococcus agalactiae* – 1236 (23,7%), *Streptococcus pneumoniae* – 1060 (20,3%), *Streptococcus pyogenes* – 497 (9,5%) (Рисунок 4).

Энтерококки (Рисунок 5) были идентифицированы 3718 раз (4 вида), в том числе *Enterococcus faecalis* – 3251 (87,5%), *Enterococcus faecium* – 277 (7,4%), *Enterococcus gallinarum* – 171 (4,6%), *Enterococcus casseliflavus* – 19 (0,5%).

Представители группы НГОБ были идентифицированы 2146 раз (Рисунок 6). Наиболее часто выделялись микроорганизмы рода *Pseudomonas* – 906 (15 видов), преимущественно *Pseudomonas aeruginosa* – 575. Другие представители группы НГОБ были идентифицированы 1240 раз: род *Acinetobacter* – 676 (14 видов, 31,5%), род *Chryseobacterium* – 369 (3 вида, 17,2%), род *Burkholderia* – 89 (4 вида, 4,2%), род *Achromobacter* – 34 (2 вида, 1,6%), род *Elizabethkingia* – 24 (2 вида, 1,1%), другие НГОБ – 48 (6 видов, 2,2%).

Микроорганизмы рода *Moraxella* были выделены 578 раз (4 вида), в том числе *Moraxella catarrhalis* – 517 (89,4%); рода *Haemophilus* – 708, в том числе *Haemophilus influenzae* – 628 (88,7%); рода *Corynebacterium* – 194 (7 видов); рода *Neisseria* – 576 (7 видов), в том числе 48 *Neisseria meningitidis*; рода *Lactobacillus* – 224 (9 видов); рода *Gardnerella* – 36 (1 вид – *Gardnerella vaginalis*).

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* были иден-

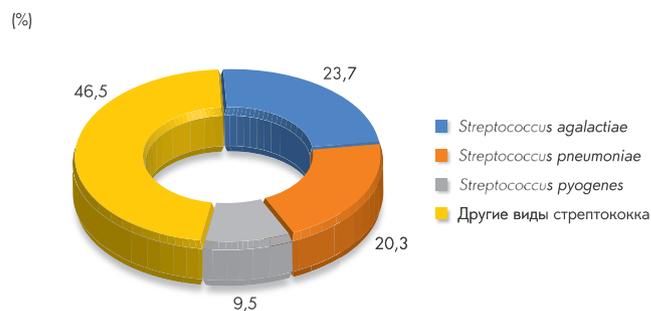


Рисунок 4. Встречаемость некоторых патогенных видов стрептококка, %

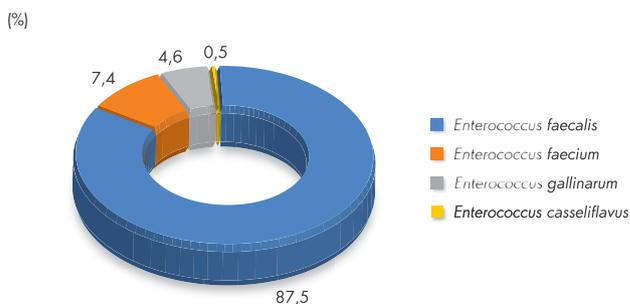


Рисунок 5. Встречаемость видов *Enterococcus*, %

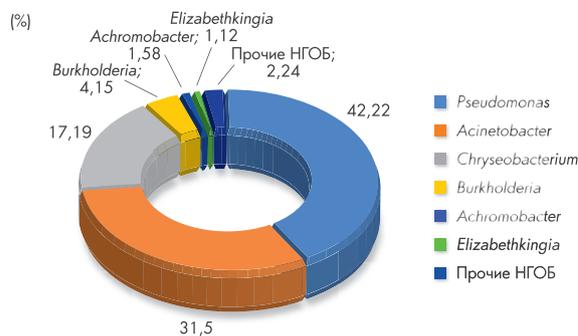


Рисунок 6. Встречаемость родов неферментирующих грамотрицательных бактерий, %

тифицированы 1682 раза (8 видов), преимущественно *Candida albicans* – 678 (40,3%).

В настоящее время процент идентификаций в лаборатории составляет: до вида с коэффициентом достоверности идентификации > 0,8 – 99,2%; до рода с коэффициентом достоверности идентификации от 0,5 до 0,79 – 0,4%; отсутствие идентификации – 0,3%; на ячейки с отсутствием спектра приходится 0,8%.

Очень хорошо (96,5%) проходит идентификация представителей семейства Enterobacteriaceae. Отлично идентифицируются *Haemophilus influenzae* и *Haemophilus* spp. С высоким коэффициентом достоверности идентификации до вида идентифицируются *Moraxella catarrhalis* и *Moraxella* spp., *Corynebacterium* spp.

Однако есть и проблемные случаи. Чаще всего мы испытывали затруднения с видовой дифференциацией стрептококков, что является общей проблемой для всех MALDI-MS-систем. Что касается пневмококков, то *Streptococcus pneumoniae* с положительной реакцией на оптохин идентифицируется почти в 100% случаев. Однако также случается, что идентифицируется *Streptococcus pneumoniae* без положительной реакции на оптохин. На начальных этапах нашей работы анализатор выдавал *Streptococcus pneumoniae* (с коэффициентом от 0,7 до 0,81) в 1,3 раза больше, чем подтвержденных *Streptococcus pneumoniae*.

Для подтверждения идентификации *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* мы использовали морфологические характеристики и фенотипические методы идентификации: тест с бацитрацином, оптохином, лизис в присутствии солей желчи, PYR-тест и латекс-агглютинацию.

Мощная полисахаридная капсула *Streptococcus pneumoniae* требует для экстракции белков применения дополнительных усилий, поэтому для дифференциации *Streptococcus pneumoniae*, особенно от стрептококков *S. mitis* группы, необходимо при пробоподготовке использовать метод белковой экстракции с муравьиной кислотой.

Использование MALDI-MS рекомендуется только для быстрого скрининга изолятов *Salmonella* с последующим определением серовара с помощью серотипирования [4], поскольку MALDI-MS-анализ ориентирован пока на видовую идентификацию. В 2018 г. было выделено 238 микроорганизмов рода *Salmonella*. По результатам серотипирования были получены следующие данные: *Salmonella enteritidis* – 208, *Salmonella infantis* (группа C) – 14, *Salmonella essen* (группа B) – 2, *Salmonella kaapstad* – 1, *Salmonella typhimurium* (группа B) – 13.

Для дифференциации сальмонелл на уровне сероваров исследователи из Германии Dieckmann R. и Malorny V. успешно применили MALDI-MS [16]. Авторы считают, что этот метод можно было бы использовать для определения сероваров *Salmonella enterica* subsp. *enterica* с пробоподготовкой прямым нанесением.

Были случаи, когда при масс-спектрометрии идентифицировалась *Neisseria gonorrhoeae* в биоматериале из ротовой полости. Для проверки идентификации культуры использовали метод ПЦР – результаты были отрицательными. Также обстояло дело с *Neisseria meningitidis*: для подтверждения идентификации *Neisseria meningitidis*

применяли биохимические тесты и агглютинацию с серогрупповыми диагностическими сыворотками. Опубликовано значительное количество работ, посвященных ошибочному определению при MALDI-MS *N. gonorrhoeae* и *N. meningitidis* от других видов нейссерий [14, 17–19].

В 2018 г. нами был подтвержден один случай выделения нетоксигенного штамма *Corynebacterium diphtheriae*. Идентификация подтверждена параллельной масс-спектрометрией контрольного штамма *Corynebacterium diphtheriae*, а также биохимическими тестами и тестом на токсигенность.

В результате накопленного опыта и серии калибровок результаты идентификации значительно улучшились и при высоких значениях коэффициента достоверности идентификации не вызывают никаких сомнений. Это значительно повысило качество выдаваемых результатов, существенно сократило время анализа, снизило потребность в повторных и дополнительных тестах.

Затраты времени на проведение одной идентификации методом масс-спектрометрии на анализаторе VactoSCREEN при нанесении культуры на одну ячейку с учетом времени на вспомогательные процедуры составили от 2,98 до 13,22 мин. Средние трудозатраты на идентификацию одной культуры (на одной ячейке) составили 0,81 условных единиц (УЕ) (8,1** мин.), что отражено в Таблице 4. Без учета затрат времени на вспомогательные процедуры (приготовление реакционных смесей, обработка плашки и т.п.) время идентификации одной культуры на микробиологическом анализаторе VactoSCREEN составляет в среднем 1,55 мин. При нанесении на плашку культуры в дублях трудозатраты увеличиваются кратно количеству нанесений.

В Таблице 5 показана фактическая нагрузка по выполнению микробиологических исследований, выполненных бактериологическим отделом МЦКДЛ в 2018 г., а также приведены расчеты экономической эффективности при использовании метода MALDI-MS для идентификации.

Снижение трудозатрат при использовании масс-спектрометрии в сравнении с ручными методами идентификации составило в среднем 3,5 раза. Годовая экономия трудозатрат составила около 90608 УЕ, что в пересчете на штатные единицы с учетом годовой нормы нагрузки в 8038,8 УЕ соответствует 11 штатным единицам (Таблица 6).

Обсуждение

Для того чтобы добиться качественной идентификации микроорганизмов, необходимо четкое соблюдение требований проведения MALDI-MS на всех этапах. Важно использовать качественные питательные среды и соблюдать сроки инкубации микроорганизмов. Необходимо очень тщательно проводить этап пробоподготовки.

Прежде всего необходимо использовать свежий ростовой материал, выращенный в течение 24 ч. или, в случае медленно растущих бактерий, в течение нескольких дней. В обзоре Croxatto A. и соавт. «Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии в клинической диагно-

Таблица 4. Трудозатраты на проведение идентификации микроорганизмов на микробиологическом анализаторе VactoSCREEN методом MALDI-MS

№	Этап (процесс)*	Время (мин.) на процесс	Время (мин.) на 1 ячейку при полной загрузке мишени	Время (мин.) на 1 ячейку при неполной загрузке мишени (от 1 до 25 ячеек)
1	Формирование плашки в ЛИС в соответствии со штрих-кодом образца	15–30	0,25	2,08
2	Отбор и нанесение подозрительных колоний на мишень (процедура прямого нанесения), высушивание 1–2 мин. после нанесения культуры и высушивание 1–2 мин. после нанесения матрицы	12–45	0,5	3,85
3	Процедура экстракции муравьиной кислотой	1–5	0,05	0,25
4	Нанесение матрицы	0,12–5	0,05	0,25
5	Установка мишени в прибор	2	0,02	0,10
6	Учет и выгрузка результатов в ЛИС	2	0,02	0,10
7	Валидация результатов идентификации	20–60	0,5	2,46
8	Приготовление раствора бактериального стандарта, аликвотирование, калибровка прибора не менее 1 раза в неделю и по мере необходимости	20	1,3	2,90
9	Приготовление 1 мл раствора растворителя и приготовление раствора матрицы (срок хранения не более 5 дней)	5	0,5	0,25
10	Процедура очистки мишени	8–10	0,2	0,99
	ИТОГО в минутах		2,98	13,22
	ИТОГО в условных единицах (УЕ)		0,30	1,32
	Среднее значение		0,81 УЕ**	

* В расчеты не включены затраты на просмотр результатов первичных посевов и отбор подозрительных колоний для идентификации.

** Данные являются результатами внутреннего хронометража и не могут быть использованы как нормативные показатели.

Таблица 5. Анализ нагрузки бактериологического отдела МЦКДЛ ГБУЗ «Городская поликлиника №107» Санкт-Петербурга в 2018 г.

Анализ нагрузки за 2018 г.	I квартал	II квартал	III квартал	IV квартал	Итого
Количество выполненных бактериологических исследований	12722	22747	20266	30210	85945
Нагрузка в УЕ	59157,3	109185,6	95655,52	134736,6	398735,02
Количество identifications	10062	13036	10443	11763	45304
Нагрузка по выполнению идентификации ручным методом	28173,6	36500,8	29240,4	32936,4	126851,2
Нагрузка по выполнению идентификации автоматическим методом	8049,6	10428,8	8354,4	9410,4	36243,2
Экономия трудозатрат при использовании масс-спектрометрии	20124	26072	20886	23526	90608,00

стической микробиологии» сообщалось, что для качественной идентификации время инкубации грамотрицательных бактерий должно быть не менее 4 ч., а грамположительных бактерий – не менее 8 ч. [12]. Причинами неудач при идентификации в некоторых случаях являются недостаточная инкубация биоматериала или наоборот, «старая культура» – более 24 ч. инкубации. При недостаточной инкубации и снятии с чашки очень мелких колоний можно зацепить питательную среду, мешающую идентификации (пример такого спектра приведен на Рисунке 7).

Возможны неправильные результаты идентификации, если культуры хранились в холодильнике при $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Качество спектров ухудшается сравнительно быстро с увеличением сроков хранения. При комнатной темпера-

Таблица 6. Нормы нагрузки на выполнение микробиологических исследований

Годовая норма нагрузки на 1 штатную единицу*		Норма нагрузки в месяц на 1 должность (УЕ)	
Мин.	УЕ	Специалист с высшим образованием	Специалист со средним образованием
80388	8038,8	675,73	710

* Приказ Минздрава РФ от 25.12.1997 № 380 «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

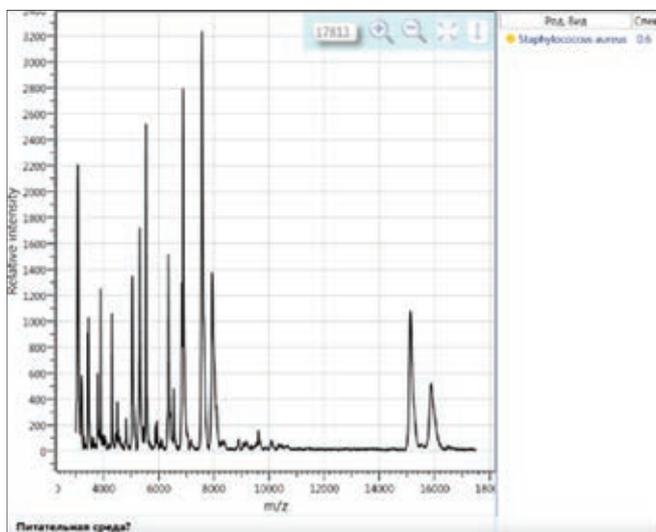


Рисунок 7. Спектр образца, полученный при попадании питательной среды на ячейку

По оси ординат указана относительная интенсивность, по оси абсцисс – m/z . Относящиеся к питательной среде спаренные пики на 15000–16000 m/z и пики двухзарядных ионов на 7500–8000 m/z затрудняют идентификацию. Несмотря на четкое разделение пиков и хорошую интенсивность, стафилококк идентифицирован лишь до рода.

туре культуры можно хранить не более 12 ч. перед нанесением на плашку/мишень.

Причинами неудачной идентификации также могут быть использование питательных сред с ингибиторами роста (теллурид калия и др.), недостаточное или избыточное количество биоматериала, нанесение смеси микроорганизмов.

Одна из возможных причин отсутствия идентификации – низкая эффективность экстракции, обусловленная особенностями микроорганизма (строение клеточной стенки, наличие капсулы, мукоидные штаммы и т.д.). В таких случаях можно применить метод, включающий дополнительную экстракцию 70% муравьиной кислотой. Но для отдельных микроорганизмов и этого бывает недостаточно. На примере коринебактерий метод с муравьиной кислотой на плашке, по сообщению Barberis С. и соавт., позволил идентифицировать изоляты *Corynebacterium* до вида только в 75,7% случаев [20]. Успешнее экстрагировать белки грамположительных бактерий позволяет метод белковой экстракции с муравьиной кислотой, хотя это занимает дополнительное время. Так, белковая экстракция с муравьиной кислотой, по результатам исследований Konrad R. и соавт., позволила правильно идентифицировать все клинические изоляты *Corynebacterium diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* и *C. ulcerans* [21].

Для повышения эффективности идентификации с помощью MALDI-MS можно рекомендовать дублировать нанесение образца на несколько ячеек плашки/мишени.

Для обеспечения качества идентификации на микробиологическом анализаторе VactoSCREEN необходимо проведение калибровки по бактериальному стандарту. На основании проведенной калибровки программное обеспечение анализатора VactoSCREEN позволяет вывести на экран и распечатать отчет о контроле качества.

Для постановки диагноза при низком значении коэффициента достоверности идентификации необходимо использовать результаты других методов исследования и учитывать клинические проявления инфекции.

Наконец, на качество идентификации могут влиять условия внешней среды в момент проведения анализа на приборе. Система работает оптимально при температуре $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. При сборе данных перепад температуры должен быть не более 3°C в час. С целью соблюдения этих требований в нашей лаборатории в помещении, где проводятся масс-спектрометрические исследования, установлены кондиционеры.

Благодаря высокому быстродействию, удобному управлению и считыванию информации идентификация микроорганизмов проводится в течение нескольких минут. Применение уникальной технологии масс-спектрометрии позволяет сократить сроки проведения микробиологического исследования на 2–3 суток. Благодаря имеющемуся резерву оборудования возможно увеличение мощности лаборатории по объемам выполнения микробиологических исследований. В свою очередь, увеличение объемов исследований обеспечит более высокую эффективность использования имеющегося в учреждении оборудования. Автоматизация технологических процессов лабораторного исследования позволяет получать более достоверные результаты в отличие от исследований, выполняемых рутинными методами; сократить сроки выполнения исследований и тем самым ускорить процесс назначения адекватной терапии пациентам.

Низкая себестоимость расходных материалов и использование многоразовых плашек/мишеней позволяют врачу проводить необходимое количество идентификаций для выделения этиологически значимых микроорганизмов без экономического ущерба и снизить затраты на лечение.

Заключение

Использование метода MALDI-MS обеспечивает быструю, высокую достоверность и эффективность диагностики. Эта технология является ценным инструментом для бактериологической идентификации в ежедневной микробиологической практике. Использование метода масс-спектрометрии позволило нам оптимизировать производственные процессы и значительно повысить производительность без увеличения штатного расписания, а также снизить себестоимость идентификации.

Литература

- Polischuk A.G. Identification of clinically relevant fungi by MALDI-TOF mass-spectrometry (review). *Problemy medicinskoj mikologii*. 2011;13(4):8-11. Russian. (Полищук А.Г. MALDI-TOF масс-спектрометрическая идентификация медицинских значимых микромицетов (обзор). *Проблемы медицинской микологии*. 2011;13(4):8-11.)
- Melkumyan A.R., Pripitnevich T.V., Ankirskaya A.S., Trofimov D.Yu., Muravyova V.V., Mullabaeva S.M., Zavyalova M.G. Lactobacilli species diversity in different states of vaginal microbiota in pregnant women. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2013;15(1):72-79. Russian. (Мелкумян А.Р., Припутневич Т.В., Анкирская А.С., Трофимов Д.Ю., Муравьева В.В., Муллабаева С.М., Завьялова М.Г. Видовой состав лактобактерий при различном состоянии микробиоты влагалища у беременных. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013;15(1):72-79.)
- Bader O., Weig M., Taverner-Ghadwal L., Lugert R., Gros 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):1359-1365. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03398.x
- 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. DOI: 10.1128/CMR.00072-12
- Chernukha M.Yu., Shaginyan I.A., Zhukhovitskiy V.G., Avetisyan L.R., Kulyastova D.G., Siyanova E.A., et al. Use of the MALDI Biotyper system and the microbiological diagnosis algorithm for identification of non-fermenting bacteria isolated from respiratory tract in cystic fibrosis patients. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2017;19(4):327-334. Russian. (Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., Жуховицкий В.Г., Аветисян Л.Р., Кулястова Д.Г., Сиянова Е.А. и соавт. Применение системы MALDI Biotyper и алгоритма микробиологической диагностики для идентификации неферментирующих микроорганизмов, выделенных из дыхательных путей у больных муковисцидозом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2017;19(4):327-334.)
- Ferreira L., Sanchez-Juanes F., Gonzalez-Avila M., Cembrero-Fucinos D., Herrero-Hernandez A., Gonzalez-Buitrago J.M., Munoz-Bellido J.L. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48(6):2110-2115. DOI: 10.1128/JCM.02215-09
- Brunetti G., Ceccarelli G., Giordano A., Navazio A.S., Vittozzi P., Venditti M., Raponi G. Fast and reliable diagnosis of XDR *Acinetobacter baumannii* meningitis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *New Microbiol*. 2018;41(1):77-79. PMID: 29112767
- Nonnemann B., Tvede M., Bjarnsholt T. Identification of pathogenic microorganisms directly from positive blood vials by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2013;121(9):871-877. DOI: 10.1111/apm.12050
- Popov D.A., Nadochey E.A., Vostrikova T.Yu., S.T. Ovseenko S.T. Accelerated techniques of pathogen identification from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2016;18(4):296-307. Russian. (Попов Д.А., Надточей Е.А., Вострикова Т.Ю., Овseenko С.Т. Ускоренные методы идентификации положительных гемокультур с применением MALDI-TOF масс-спектрометрии. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2016;18(4):296-307.)
- Amineva P.G., Rudnov V.A., Karmatskikh O.G., Nevskaya N.N., Belsky D.V., Ivanova N.A. The results of identification of bacteria from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2018;20(4):381-386. Russian. (Аmineва П.Г., Руднов В.А., Кармацких О.Г., Невская Н.Н., Бельский Д.В., Иванова Н.А. Результаты идентификации бактерий из положительных гемокультур пациентов многопрофильного стационара с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018;20(4):381-386.) DOI: 10.36488/смас.2018.4.381-386
- Pripitnevich 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. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2014;16(1):4-9. Russian. (Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Бурменская О.В., Непша О.С., Никитина И.В., Любасовская Л.А. и соавт. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014;16(1):4-9.)
- Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36:380-407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x
- Burckhardt I., Zimmermann S. Susceptibility testing of bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Front Microbiol*. 2018;9:1744. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01744
- Dubois D., Grare M., Prere M.-F., Segonds C., Marty N., Oswald E. Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *J Clin Microbiol*. 2012;50(8):2568-2576. DOI: 10.1128/JCM.00343-12
- Alatoom A.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):2868-2873. DOI: 10.1128/JCM.00506-11
- Dieckmann R., Malorny B. Rapid Screening of Epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(12):4136-4146. DOI: 10.1128/AEM.02418-10
- Cunningham S.A., Mainella J.M., Patel R. Misidentification of *Neisseria polysaccharea* as *Neisseria meningitidis* with the use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2014;52(6):2270-2271. DOI: 10.1128/JCM.00664-14
- Morel F., Desroches M., Jacquier H., Fihman V., Cambau E., Decousser J.W., Bercot B. Performance of Andromas and Bruker MALDI-TOF MS in the identification of *Neisseria*. Proceedings of the 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 2017 April 22-25; Vienna, Austria. EV0192.
- Kawahara-Matsumizu M., Yamagishi Yu., Mikamo H. Misidentification of *Neisseria cinerea* as *Neisseria meningitidis* by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Jpn J Infect Dis*. 2018;71:85-87. DOI: 10.7883/yoken.JIID.2017.183
- Barberis C., Almuzara M., Join-Lambert O., Ramirez M.S., Famiglietti A., Vay C. Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. *PLoS One*. 2014;9(9):e106303. DOI: 10.1371/journal.pone.0106303
- Konrad R., Berger A., Huber I., Boschert V., Hörmansdorfer S., Busch U., et al. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria associated bacteria. *Euro Surveill*. 2010;15(43):19699. DOI: 10.2807/ese.15.43.19699-en