

8. Beck J., Bierau S., Balzer S., Andag R., Kanzow P., Schmitz J. et al. Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury. *Clin. Chem.* 59: 1732-41.
9. Vogelstein B., Kinzler K.W. Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 9236-41.
10. Zhong Q., Bhattacharya S., Kotsopoulos S., Olson J., Taly V., Griffiths A.D. et al. Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. *Lab. Chip.* 2011; 11: 2167-74.
11. Chiu R.W., Poon L.L., Lau T.K., Leung T.N., Wong E.M., Lo Y.M. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin. Chem.* 2001; 47: 1607-13.
12. Lun F.M., Tsui N.B., Chan K.C., Leung T.Y., Lau T.K., Charoenkwan P. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 19920-5.
13. Barrett A.N., McDonnell T.C., Chan K.C., Chitty L.S. Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia. *Clin. Chem.* 2012; 58: 1026-32.
14. Hayden R.T., Gu Z., Ingersoll J., Abdul-Ali D., Shi L., Pounds S., Caliendo A.M. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51: 540-6.
15. Gevensleben H., Garcia-Murillas I., Graeser M.K., Schiavon G., Osin P., Parton M. et al. Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19: 3276-84.
16. Evans M.I., Wright D.A., Pergament E., Cuckle H.S., Nicolaides K.H. Digital PCR for noninvasive detection of aneuploidy: power analysis equations for feasibility. *Fetal. Diagn. Ther.* 2012; 31: 244-7.
17. Huggett J.F., Foy C.A., Benes V., Emslie K., Garson J.A., Haynes R. et al. The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clin. Chem.* 2013; 59: 892-902.

Поступила 16.01.14
Received 16.01.14

© ПАТЕЛЬ Р., 2014

УДК 616-074:543.42.062:616-078

Патель Р.

MALDI-TOF-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ: ТРАНСФОРМАТИВНАЯ ПРОТЕОМИКА ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine and Pathology, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN; Patel Robin. MALDI-TOF-mass-spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology. *Clin. Chem.* 2013; 59:2: 340-2.

Клинические микробиологические лаборатории в настоящее время действуют, используя смесь высоко- и низко-технологичных методик. Несмотря на огромные шаги вперед методов диагностики, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, клинические микробиологические лаборатории в значительной мере полагаются на культивирование бактерий и грибов для целей диагностики из-за обилия и разнообразия потенциально изолируемых организмов. Для выделения чистой культуры используют плотные (например, кровяной агар) или жидкие (например, бульон) питательные среды. Обнаружив рост (колонию), приступают к ее идентификации. Исторически идентификация рассматривалась как комплексная задача, ей посвящены многочисленные руководства. Традиционная (фенотипическая) идентификация бактерий и грибов включает морфологию, окраску и биохимические тесты (ручные или автоматизированные панели). Ручные биохимические тесты выполняются быстро, но они идентифицируют лишь ограниченное число типов организмов. Автоматизированные системы (VITEK®, bioMérieux; BD Phen ix™ Automated Microbiology System; MicroScan® Siemens Healthcare Diagnostics) идентифицируют более широкий круг организмов, однако требуют более длительного времени и дорогих расходных материалов. Пользователь часто должен а priori знать тип микроорганизма,

который исследуется (например, грамотрицательные палочки). Внедрение MALDI-TOF-масс-спектрометрии в работу клинических микробиологических лабораторий заметно изменило производственный процесс, позволяя точно, быстро и недорого идентифицировать бактерии и грибы. Применение в клинической микробиологии масс-спектрометрии и информационных технологий вводит новую методологию идентификации бактерий и грибов.

Использование MALDI-TOF-масс-спектрометрии в клинических микробиологических лабораториях можно объяснить этапами производственного процесса. Изолированную колонию, выросшую на плотной питательной среде, отбирают и помещают на определенное место на пластину MALDI-TOF-масс-спектрометра, которая может иметь определенное количество тестовых позиций (например, 24, 48, 96, 384). Микроорганизм, размещенный на пластине, покрывают небольшим количеством матрицы (например, 1-2 мкл α -циано-4-гидроксициннамовой кислоты, разведенной в 50% ацетонитриле и 2,5% трифторуксусной кислоте). Пластина высушивается (обычно в течение 5 мин или меньше). Идентификацию, контроль контаминации реагентами и исследования калибровочных стандартов производят в отдельных позициях пластины. Пластина помещается в камеру MALDI-TOF-масс-спектрометра. Процесс автоматизирован (после

Address correspondence to the author at: Mayo Clinic, 200 First St, SW, Rochester, MN 55905, Fax 507-284-4272, e-mail: patel.robin@mayo.edu

Перевод статьи публикуется в соответствии с соглашением между редколлегией журналов «Clinical Chemistry» и «Клиническая лабораторная диагностика».

калибровки инструмента), масс-спектры изолята генерируются и сравниваются с базой данных референтного спектра. Программа сопоставляет спектр исследуемого изолята с известными спектрами из библиотеки данных, фиксируя перечень возможных микроорганизмов (ранжированных по шкале или в процентах) и оценивая уровень достоверности идентификации. Не требуется формальной интерпретации масс-спектра технологом, поскольку задача решена программой в аналоговом режиме по системе поиска Google. Одновременно могут быть исследованы несколько изолятов. Аналитическое время оборота теста составляет ≤ 3 мин на изолят. Для проведения исследования требуется мало расходных материалов и реагентов, пластины могут использоваться многократно, что делает этот вид исследований в известной степени “зеленым” по сравнению с основанными на традиционных биохимических тестах автоматических инструментах. По желанию лаборатория может заказать одноразовые пластины для MALDI-TOF-масс-спектрометра.

Каким образом MALDI-TOF-масс-спектрометрия идентифицирует бактерии и грибы? Интактный организм внедрен в матрицу, которая способствует последовательной десорбции и ионизации микробных белков. Высушенное пятно, содержащее матрицу и микроорганизм, подвергается множественным ударам лазера. Матрица защищает микробные белки, переводит энергию лазера в энергию возбуждения и способствует десорбции [испарению] и ионизации микробных белков, которые первоначально в высокой степени насыщены рибосомальными белками, хотя аналиты не идентифицированы специфично. Ионизированные аналиты поступают в проточный канал и разделяются соответственно их соотношениям масса–заряд, хотя, поскольку аналиты обычно одинаково заряжены MALDI-масс-спектрометрией, разделение осуществляется соответственно одной массе. Небольшие аналиты двигаются быстрее и достигают детектора первыми, затем поступают все более крупные аналиты. Формируется масс-спектр, представляющий число ионов, достигших детектора в конце проточного канала за определенное время (время пролета).

MALDI-TOF-масс-спектрометрия полезна для применения в клинической микробиологии за счет сочетания мощных аналитических возможностей и хорошо составленной базы данных о спектрах, которые представляют клинически значимые бактерии и грибы. Доступны две коммерческие системы (включающие коммерческие базы данных) – Bruker Biotyper (Bruker Daltonics) и VITEK® MS (bioMérieux). Как и с любой системой идентификации, ограничения каждой базы данных должны быть ясны, особенно в отношении тех организмов, которые не были захвачены или были неправильно идентифицированы. В целом базы данных коммерческих систем достаточны для аэробных грамотрицательных палочек и

грамположительных кокков, но могут быть неполными для эзотеричных организмов [например, анаэробные бактерии]. Ввиду быстромменяющихся номенклатуры и описания новых видов необходимо постоянное обновление коммерческих баз данных, используемых в клинических лабораториях. Лаборатории способны составлять собственные базы данных о масс-спектрах, собирая реквизиты клинических изолятов.

Насколько хорошо осуществляется идентификация микроорганизмов с применением MALDI-TOF-масс-спектрометрии? На этот вопрос пытались ответить многие исследователи. В клинике Мейо автор сравнивал автоматическую систему идентификации, основанную на биохимических тестах [автоматическая микробиологическая система BD Phoenix] с масс-спектрометрической системой Bruker Biotyper для идентификации грамотрицательных бактерий. BD Phoenix правильно идентифицировал 363 (83%) и 330 (75%) изолятов до рода и вида, тогда как система масс-спектрометрии правильно идентифицировала 408 (93%) и 360 (82%) изолятов до рода и вида, статистически превзойдя сравниваемую систему. Система Bruker Biotyper оценена в отношении способности идентифицировать 298 клинических изолятов стафилококков, стрептококков и близких им родов [1]. Система MALDI-TOF-масс-спектрометрии правильно идентифицировала 284 (95%) и 207 (69%) изолятов до рода и вида соответственно. Был произведен анализ в подгруппах стафилококков, стрептококков, энтерококков ($n=217$) и близких им родов ($n=81$). В первой подгруппе 213 (98%) и 171 (79%) изолят идентифицированы до рода и вида соответственно. В подгруппе близких им родов только 71 (88%) и 36 (44%) изолятов идентифицированы до рода и вида соответственно. Система Bruker Biotyper также валидирована в отношении идентификации рода *Corynebacterium* как наиболее проблемного в отношении идентификации до рода по сравнению с обычными грамотрицательными бактериями и грамположительными кокками. 90 (87%) из 92 изолятов были идентифицированы до вида, идентификация была точной за исключением *Corynebacterium aurimucosum*, которую перепутали с близкой *Corynebacterium minutissimum*. Система Bruker Biotyper применена также для идентификации 138 обычных и 103 архивных изолятов плесени; установлено 96 и 85% точных идентификаций до рода для обычных и музейных образцов плесени соответственно. Дальнейшая оценка дерматофитов ($n=171$) с помощью системы Bruker Biotyper идентифицировала 93% изолятов дерматофитов до уровня рода и 60% до уровня вида.

Исследователи из разных стран сообщают об идентификации до рода в 96–99% случаев и до уровня вида в 85–97% при тестировании изолированных бактерий и плесеней с использованием Bruker Biotyper MALDI-TOF-масс-спектрометрии (см. таблицу) [2–5]. MALDI-TOF-

Международный опыт применения системы Bruker Biotyper MALDI-TOF-масс-спектрометрии для рутинной идентификации бактерий (и грибов) в клинической лаборатории

Изоляты			Идентификация, %		Страна	Сравниваемые системы	Источники литературы
число	тип	период выделенения, мес	до уровня рода	до уровня вида			
1371	Бактерии, грибы	1	98	93	Швейцария	VITEK2, API, биохимические тесты	Bizzini A. et al. [2]
1013	Бактерии	2	99	97	Франция	Phoenix, API, биохимические тесты	Bessede E. et al. [3]
468	Бактерии	3	97	92	Япония	MicroScan, API, Phoenix	Sogawa K. et al. [4]
2781	Бактерии	1	96	85	Австралия	VITEK2, API, биохимические тесты	Neville S.A. et al. [5]

масс-спектрометрия использована для идентификации других видов бактерий (например, анаэробных бактерий, микобактерий) и грибов, хотя в некоторых случаях применены специальная обработка или усиленная база данных.

Стремясь внедрить новую технологию, клинические лаборатории должны сделать выбор между Bruker Biotyper и VITEK® MS, хотя ни одна из этих систем не получила одобрения Администрации США по пищевым продуктам и лекарствам (FDA) для исследования изолятов пациентов. Аналитические принципы, лежащие в основе этих систем, близки, однако существуют фундаментальные различия в алгоритмах, использованных для идентификации организмов и в базах данных. Масс-спектрометр Bruker MikroFlex LT является настольным прибором, тогда как VITEK® MS представлен напольной моделью. Числовые значения, образуемые программами каждой системы, производятся различными алгоритмами и представлены на отличающихся друг от друга шкалах и поэтому не являются взаимозаменяемыми или обязательно сопоставимыми. Несмотря на эти различия, характеристики выполнения систем и точность идентификации изолятов остаются схожими в тех немногочисленных исследованиях, которые проведены до настоящего времени. Имеются указания на необходимость предварительной подготовки перед рутинным применением, включая установление точного порогового значения для надежной идентификации, разработку жесткого контроля качества и необходимость подготовительной экстракции [1].

Одним из ограничений этой технологии является отсутствие способности оценивать резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам. Проводится разработка такой методики, однако убедительных результатов еще не достигнуто, требуются дальнейшие исследования и анализ методов, отличающихся от описанных выше. Технология, за редкими исключениями, не применяется непосредственно к клиническим образцам – микроорганизмы должны быть выделены в чистой культуре. Быстрая идентификация микроорганизмов, растущих на средах с гемокультурой, продолжает оставаться многообещающей методикой, но пока еще сохраняется необходимость подготовительной обработки. Применение масс-спектрометрии в клинической микробиологической лаборатории требует химической

гигиенической практики, отличающейся от традиционно применяемой микробиологами, однако эта трудность может быть легко преодолена путем соответствующего обучения лабораторного персонала.

MALDI-TOF-масс-спектрометрия является качественным скачком вперед в идентификации бактерий и грибов в клинической микробиологической лаборатории. Быстрая и легкая идентификация бактерий и грибов с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии является неопровержимым успехом для клинических лабораторий, и снижение прямых и косвенных расходов (реагенты стоят 0,25 долл. США на исследованный изолят, что во много раз ниже, чем для традиционной автоматизированной идентификации, основанной на биохимических тестах) является преимуществом для лабораторий и пациентов. Приведет ли внедрение MALDI-TOF-масс-спектрометрии в клинические микробиологические лаборатории к существенному улучшению исходов для пациентов, должны установить дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alatoon A.A., Cunningham S.A., Ihde S.M., Mandrekar I., Pantel 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: 2868-73.
2. Bizzini A., Durussel C., Bille I., Greub G., Prod'homme G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 1549-54.
3. Bessede E., Angla-Gre M., Delagarde Y., Sep Hieng S., Menard A., Megraud F. Matrix-assisted laser desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a University Hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17: 533-8.
4. Sogawa K., Watanabe M., Sato K., Segawa S., Ishii C., Miyabe A. et al. Use of the MALDI Biotyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011; 400: 1905-11.
5. Neville S.A., Lecordier A., Ziochos H., Chater M.I., Gosbel I.B., Maley M.W., van Hal S.I. Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49: 2980-4.

Поступила 16.01.14

Received 16.01.14

© ЙЕСТЕ А., КИНТАНА Ф., 2014

УДК 616-092:612.017.11-078.33

Йесте Ада¹, Кинтана Франциско Й.^{1*}

МИКРОЗОНДЫ АНТИГЕНОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

¹Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA; Yeste Ada, Quintana Francisco J. Antigen microarrays for the study of autoimmune diseases. *Clin. Chem.* 2013; 59:7: 1036-44.

Основание: в иммунной реакции участвует активация гетерогенных популяций Т- и В-клеток, что приводит к разным степеням аффинности и специфичности для целевых антигенов. Хотя разработано много тех-

нологий для изучения молекулярных путей, которые контролируют иммунитет, имеется необходимость высокопроизводительных исследований для мониторинга специфичности иммунной реакции.

* Address correspondence to this author at: Center for Neurologic Diseases, Harvard Medical School, 77 Avenue Louis Pasteur, NIM 714, Boston, MA 02115. Fax 617-525-5305; e-mail: fqintana@rics.bwh.harvard.edu.

Перевод статьи публикуется в соответствии с соглашением между редколлежиями журналов "Clinical Chemistry" и "Клиническая лабораторная диагностика".