

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Излагаются принципы, возможности и достоинства технологий идентификации чистых культур микроорганизмов по спектру белков микробов – метод белкового профилирования. Представлена информация об основных моделях оборудования, необходимого для проведения масс-спектрометрических и масс-хроматографических исследований, его производителях и распространителях.

Ключевые слова: идентификация; масс-спектрометрия; белковое профилирование.

¹GLUSHANOVA N.A., ¹BLINOV A.I., ²ALEKSEEVA N.B.

¹Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medical,

²City Clinical Hospital N 2 St. George the Victorious,

Novokuznetsk

MASS - SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF MICRO-ORGANISMS

Sets out the principles, opportunities and dignity of identification technologies of pure cultures of microorganisms in the spectrum of proteins of microbes - the method of protein profiling. Provides information on the basic models of the equipment needed for mass spectrometry and mass chromatographic studies, his producer and a distributor.

Key words: identification; mass spectrometry; protein profiling.

Применяемый на сегодняшний день классический бактериологический метод диагностики инфекционных заболеваний имеет значительные ограничения и недостатки: высокая стоимость, длительность исследования, обусловленная скоростью деления бактериальной клетки. Кроме того, значительная часть патогенных микроорганизмов, в частности, представители анаэробной бактериальной флоры, являются трудно культивируемыми или некультивируемыми, и фактически не определяются в большинстве клинических микробиологических лабораторий. Используемый в качестве дополнительного серологический метод является непрямым – определяется не возбудитель, а иммунный ответ на него, который может иметь индивидуальные вариации. Это служит помехой для интерпретации результатов и принятия адекватных клинических решений.

Значительную сложность в работе бактериолога представляет идентификация выделенных

бактерий. До настоящего времени с этой целью в лабораториях практического здравоохранения используются преимущественно фенотипические методы.

Однако фенотипическая идентификация имеет ряд существенных недостатков:

- субъективность выбора и ограниченность набора изучаемых таксономических признаков и их оценки;
- высокая изменчивость микроорганизмов;
- малая информативность (фенотипически проявляется только 5-20 % информации генома);
- трудоемкость, высокие требования к уровню квалификации персонала, сравнительно низкая стандартизация.

В результате по фенотипическим признакам ошибочно идентифицируется до 30-50 % культур.

Поэтому рутинная ручная фенотипическая идентификация бактерий сложна, продолжительна, ненадежна и не соответствует современным потребностям клинической практики.

Существенно повышает точность классической фенотипической идентификации (до 70-80 %) использование современных полуавтоматических и автоматических микробиологических анализаторов. Но и они имеют свои недостатки и ограничения. Для идентификации с помощью автоматического анализатора необходимо выделение возбудителя в чистой культуре, на что требуется время. Собственно на идентификацию выделенной чистой культуры возбудителя требуется еще не менее 18-24 часов (только «быстрые» панели позволяют провести идентификацию в течение 4-6 часов). Кроме того, автоматизированные системы непригодны для идентификации новых видов микроорганизмов, «проблемных», «редких» бактерий и изолятов с нетипичными биохимическими свойствами. Наконец, широкое применение автоматических бактериологических анализаторов ограничивают высокие цены на оборудование и расходные материалы.

В связи с изложенным, разрабатываются и внедряются в лабораторную диагностику новые высокоэффективные гибридизационные технологии и физические методы исследования, в том числе не требующие предварительного выделения чистой культуры: мультипраймерная полимеразная цепная реакция (ПЦР), лигазная цепная реакция (ЛЦР), Dot-гибридизация, биочипы-микрочипы, масс-спектрометрия, газовая и жидкостная хроматография, а также сочетание масс-спектрометрии и хроматографии [1, 2, 5].

ПЦР имеет несомненные преимущества: прямое определение возбудителя, высокие специфичность, чувствительность, скорость исследования, универсальность, возможность диагностики хронических и латентных инфекций. Однако имеются и недостатки: риск контаминации образцов во время пробоподготовки, ведущий к получению ложноположительных результатов, ингибция реакции гибридизации гепарином, невозможность количественной оценки результатов и оценки жизнеспособности обнаруженного возбудителя. Существует так же вероятность получения ложноотрицательных результатов при определении лекарственной устойчивости бактерий с помощью ПЦР в реальном времени, т.к. выявляются только мутации, внесенные в методику. ПЦР не пригодна для оценки эффективности лечения сразу после его окончания.

Широкое использование методов гибридизации сдерживает необходимость приобретения дорогостоящего оборудования, высокая стоимость исследования и недостаточный ассортимент коммерческих тест-систем, поскольку исследования международного проекта Human microbiome («Микробиом человека») еще не завершены и геном многих возбудителей не секвенирован.

Высокоэффективная диагностика путем гибридизации нуклеиновых кислот на биочипах в

нашей стране пока не получила широкого использования в практических лабораториях.

Лигазная цепная реакция (LCR) и метод специфической флюоресцентной гибридизации в процессе амплификации (Fluorescent Amplification-based Specific hybridization – FLASH) еще не доведены до практического применения.

Практическое здравоохранение нуждается во внедрении более надежных, экспрессных и точных методов выявления и идентификации возбудителей инфекции, например, метода масс-спектрометрии (MS) [1].

Современные научные исследования доказали, что состав белков, как и липидов бактериальной клетки, детерминирован генетически, что позволяет использовать их для надежной идентификации микроорганизмов. Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов может быть осуществлена двумя способами: по спектру белков микробов – белковое профилирование (MALDI-TOF MS) и по клеточным липидам – метод газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ/МС).

Масс-спектрометрия берет свое начало в 1912 г. когда Дж. Дж. Томсон создал первый масс-спектрограф и получил масс-спектры молекул кислорода, азота, угарного газа, углекислого газа и фосгена. Сегодня трудно представить область человеческой деятельности, где не нашла бы применения масс-спектрометрия.

MS получает все более широкое использование в медицине: разработка новых лекарственных средств, контроль их производства, генная инженерия и биохимия, протеомика. В клинических лабораториях метод находит применение для масс-спектрометрического выявления большинства стероидных гормонов (включая экзогенного происхождения) и определения уровня аминокислот и ацилкарнитинов [2]. MS позволяет идентифицировать белки, определять их структурные изменения вследствие различных взаимодействий при их воспроизводстве, определять пути метаболизма лекарственных средств и других соединений и идентифицировать метаболиты, разрабатывать новые лекарственные средства.

Без масс-спектрометрии невозможен контроль над незаконным распространением наркотических и психотропных средств, криминалистический и клинический анализ токсичных препаратов, анализ взрывчатых веществ.

Находит MS применение и в микробиологии. Апробация метода MALDI-TOF для идентификации возбудителей чумы свидетельствует об эффективности MALDI-TOF анализа для достоверной и эффективной межвидовой дифференциации возбудителей чумы от других представителей рода *Yersinia*, а также для внутривидовой иден-



тификации *Y. pestis* [3]. Появились сообщения о возможности использования метода MALDI-TOF для диагностики холеры и пищевых токсикоинфекций, вызванных галофильными вибрионами [4].

Внедрение в клиническую микробиологию технологий, основанных на масс-спектрометрии MALDI-TOF MS (Нобелевская премия, 2002 г., Танака Коити) открыло новые возможности очень точной идентификации возбудителей инфекционных заболеваний. MS наиболее эффективна при анализе нуклеиновых кислот (ДНК/РНК), белков и пептидов бактерий.

MALDI-TOF MS идентификация микроорганизмов основана на определении уникального для каждого вида микроорганизмов набора белков — своеобразный «отпечаток пальца» (фингерпринтинг) микроорганизма, «протеомная дактилоскопия». Идентификация осуществляется в основном по рибосомальным белкам, которые присутствуют во всех микроорганизмах.

Сущность метода заключается в превращении (с помощью лазерных импульсов) органического вещества микроорганизмов в заряженные частицы - ионы. Этот процесс называется ионизацией. При этом молекулы вспомогательного вещества — матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота), и изучаемого микроорганизма (в частности, белки) переходят в газовую фазу, а молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Полученные в результате ионизации ионы с помощью электрического поля переносят в газовую фазу вакуумной части масс-спектрометра. В глубоком вакууме анализатора под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам. Так происходит сортировка заряженных ионов по массам (точнее, по отношению массы к заряду, или m/z) по времени пролета ими определенного расстояния. После попадания ионов на детектор и оцифровки результата программа масс-анализатора оценивает время пролета частиц, строится масс-спектр — график, по оси абсцисс которого находится соотношение m/z , а по оси ординат — количество ионов, зарегистрированных детектором в конкретный момент времени. Полученный масс-спектр сопоставляется со спектрами из базы данных масс-анализатора, и на основании сведений о массах характеристических белков осуществляется идентификация микроорганизмов.

Для проведения MALDI-TOF MS идентификации возбудителей требуется масс-спектрометр, соответствующая программа и база данных.

Методика проведения идентификации проста и **состоит из двух этапов:** подготовки исследуемой чистой культуры микроорганизма и собственно идентификации.

Подготовка культуры. На подложке масс-анализатора смешивают идентифицируемые микроорганизмы (взяты из чистой культуры, отдельной колонии, среды обогащения) и раствор матрицы. Для подготовки 24 культур требуется 10 минут, для 96 изолятов — 33 минуты.

Идентификация культуры. Подготовленную культуру помещают в масс-анализатор и подвергают воздействию лазерных импульсов (ионизация). Далее процесс идентификации осуществляется с помощью масс-спектрометра автоматически, без вмешательства исследователя. Идентификация культуры одного микроорганизма завершается менее чем за 2 минуты. Для идентификации 24 культур требуется 12 минут, для 96 культур — 43 минуты.

Основные достоинства и преимущества MALDI-TOF MS:

- позволяет отказаться от длительной, трудоемкой и ненадежной фенотипической идентификации микроорганизмов;
- невысокие требования к квалификации персонала;
- не требуется специальных расходных материалов;
- быстрая и простая пробоподготовка — 5 мин/образец;
- высокая чувствительность — 10^4 - 10^5 клеток — единичная колония или центрифугат жидкой культуры;
- возможность видовой идентификации любых видов культивируемых микроорганизмов: мицелиальных грибов, дрожжей, грам(+) и грам(-) бактерий;
- высокая скорость идентификации — 1 мин/образец, 1,5 часа при одновременном исследовании 96 проб на панели;
- высокая точность видовой идентификации (превышает 98 %);
- снижение себестоимости каждого исследования в 12-96 раз (в среднем в 37 раз) в сравнении с фенотипическими (ручными и автоматизированными) методами.

Благодаря названным качествам в настоящее время MALDI-TOF MS вытесняет традиционные методы не только в исследовательских центрах, но и в крупных зарубежных клинических лабораториях. Так, более 100 европейских медицинских центров перешли на использование MALDI-TOF MS.

Относительный недостаток метода масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов — для исследования необходимо предварительно выделить чистую культуру возбудителя, что увеличивает продолжительность исследования. Однако технология масс-спектрометрии непрерывно совершенствуется. В настоящее время проводятся клинические испытания методик с использованием системы MALDI Biotyper для

идентификации микроорганизмов непосредственно в моче.

Лабораторная апробация метода в межклинической бактериологической лаборатории ММА им. И.М. Сеченова показала эффективность — 99,7 %. Расхождения с бактериологическими данными получены в 4,5 %.

Аналогичным образом система MALDI BIOTYPER используется для прямого исследования и идентификации положительной гемокультуры. Процедура пробоподготовки при этом состоит из последовательных центрифугирований образца и занимает не более 20 мин.

По данным Припутневич Т.В. и соавт. при тестировании 50 положительных гемокультур (во флаконах) методом прямой масс-спектрометрии идентифицировано до вида 76 % микроорганизмов [1].

Таким образом, метод MALDI-TOF MS представляется быстрым и достоверным при диагностике септических состояний, вызванных одним возбудителем.

MALDI-TOF MS в определении чувствительности/резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АМП).

Важным качеством MALDI-TOF MS является возможность не только идентифицировать выделенного возбудителя, но и успешно решить другую фундаментальную задачу микробиологического исследования — определить его чувствительность или резистентность к антимикробным препаратам.

Непосредственно метод масс-спектрометрии не может быть использован для прямого определения чувствительности бактерий к антимикробным агентам. Поэтому идентификацию возбудителя и определение его чувствительности к АМП и МИК производят с помощью гибридной аппаратуры — объединяя с помощью специальной программы два отдельных анализатора: масс-спектрометр (идентификация) и автоматический бактериологический анализатор (определение чувствительности к АМП и МИК).

Программа отслеживает все действия, выполняемые на микробиологическом лабораторном столе, через компьютерное приложение обеспечивает взаимодействие между анализаторами и лабораторной информационной системой (ЛИС), обеспечивая полную автоматизацию процессов в лаборатории.

Для проведения исследования используется микробиологический анализатор BIOMIC V3, который применяется как для идентификации бактерий и определения чувствительности к антибиотикам.

Оборудование BIOMIC V3 может быть использовано вместе с любым из комплектов бактериологической лаборатории MALDI BioTyper «Стандарта» или для дополнительного оснаще-

ния лаборатории. Для биохимической идентификации микроорганизмов могут быть использованы идентификационные панели разных производителей: API®, RapID, Crystal™, а также 96-луночные плашки для микротипирования. Возможно сохранение цветных изображений панелей и плашек.

Для определения чувствительности к АБ применяются диско-диффузионный метод, E-тесты, панели (ID-тесты) и хромогенные среды; также выполняется подсчет количества колоний.

Сочетание масс-спектрометрии с минисеквенированием, осуществляемым на базе стандартной ПЦР лаборатории, позволяет осуществлять исследования генетических основ устойчивости микроорганизмов к антибиотикам (выявляя мутации в генах, отвечающих за резистентность исследуемого организма). На основании таких исследований можно осуществлять мониторинг распространенности различных резистентных штаммов микроорганизмов (например, в регионе).

Таким образом уже сегодня MALDI-TOF масс-спектрометрия активно применяется в микробиологии для быстрой и точной идентификации и определения чувствительности/**устойчивости бактерий** к антибиотикам. Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов по белковым профилям является наиболее современной, простой и точной технологией. Метод обеспечивает высокую производительность и практически 100% специфичность и чувствительность, а также непревзойденную скорость анализа. Эта технология, несомненно, поднимает на новый уровень микробиологическую диагностику инфекционных заболеваний.

Использование MALDI-TOF в сочетании с автоматизацией исследования чувствительности к антибиотикам позволяет не только точно и быстро определить виды микроорганизмов, но и чувствительность их к конкретным антибиотикам в минимальных ингибирующих концентрациях.

В связи с изложенным при разработке концепции полностью автоматизированной микробиологической лаборатории Work Cell Automation (WCA-BD Kiestra) предусматривается использование масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов [9].

Для масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов используется несколько систем.

На сегодняшний день наиболее известной является система MALDI Biotyper, созданная на базе MALDI масс-спектрометров последнего поколения производства компании Bruker Daltonik GmbH, Германия: масс-спектрометр Microflex, масс-спектрометр Autoflex, масс-спектрометр Ultraflex.

Система используется для идентификации любых микроорганизмов, выращенных в лабораторных условиях. Возможно использование любого

типа среды — это не оказывает влияния на получаемый результат.

Система позволяет работать с разными объектами: биологическими жидкостями, положительными гемокультурами, посевами бактерий на питательных средах, мочой, ликвором и жидкими средами, содержащих достаточное количество микроорганизмов.

Успешно применяется как в рутинной практике клинико-бактериологических лабораторий, так и для осуществления санитарно-эпидемиологических исследований.

Система MALDI BioTyper позволяет идентифицировать единичные чистые культуры патогенных микроорганизмов в течение нескольких минут. Идентификация 200 культур (с учетом пробоподготовки) занимает около часа. При этом себестоимость одной идентификации в 100-50 раз ниже стоимости аналогичного исследования на автоматическом бактериологическом анализаторе и в 10 раз дешевле идентификации с помощью других масс-спектрометрических систем.

Готовая база данных микроорганизмов и простое в использовании аналитическое программное обеспечение на русском языке позволяют осуществлять четкую идентификацию тысяч видов бактерий, мицелиальных и дрожжевых грибов.

База данных (БД) системы MALDI Biotyper на 05/2013 содержала информацию о белковых профилях около 4000 штаммов более 2200 видов, более 360 родов микроорганизмов.

Система **Vitek MS (Биомерье, Франция)**. Для одновременной идентификации возбудителя и определения его антибиотикочувствительности компания совместила два анализатора: Vitek MS (масс-спектрометрическая идентификация) и автоматический бактериологический анализатор Vitek 2 (определение чувствительности к АМП и МИК). Связь между анализаторами осуществляется с помощью **программного обеспечения MYLA** (входит в комплектацию Vitek MS).

База данных Vitek MS включает 755 клинически значимых видов (бактерий, дрожжей, плесневых грибов/дерматофитов, микобактерий) встречающихся в практике микробиологических лабораторий.

Система Axima @SARAMIS. Система идентификации микроорганизмов Axima @SARAMIS — это экспертная система идентификации микроорганизмов SARAMIS (Spectral Archive And Microbial Identification System) серии Axima, Shimadzu. На начало 2009 г. в базе данных системы содержались суперспектры более чем 1600 видов и 230 родов микроорганизмов. В базу данных SARAMIS входит также коллекция первичных масс-спектров микроорганизмов FingerPrintSpectra, содержащая более 50000 образцов.

В нашей стране ограничивает использование MALDI-TOF масс-спектрометрии отсутствие в лабораториях необходимого оборудования.

В России необходимое оборудование для масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов поставляет НПФ «Литех». Фирма поставляет два варианта комплектации бактериологической лаборатории MALDI BioTyper: «Стандарт» и «Стандарт+». Модели и количество приборов изменяются в зависимости от целей и задач исследования. Базовым прибором в комплекте «Стандарт» является масс-спектрометр Microflex.

Оборудование успешно используется в ряде ведущих медицинских научных центров. По данным на 2011 г., в лечебно-профилактических учреждениях России было установлено более 30 систем MALDI [9, 10].

MALDI-TOF MS в генетических исследованиях (минисеквенирование ДНК). Помимо микробиологических, масс-спектрометры MALDI-TOF MS позволяют проводить генетические исследования (минисеквенирование ДНК).

По наличию в составе ДНК обследуемого человека наследуемых генетических изменений можно судить о величине риска развития заболеваний под действием различных факторов.

Для осуществления MALDI-TOF минисеквенирования может быть использован любой из масс-спектрометров серии Flex компании Bruker (MicroFlex, AutoFlex, ultrafleXtreme). Специально для задач генотипирования компания Bruker (Германия) разработала программу Genotools.

Генотипирование с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии — эффективная и высокопроизводительная технология, позволяющая быстро и относительно недорого идентифицировать единичные нуклеотидные полиморфизмы (SNP).

Благодаря **масс-спектрометрии** по системе MALDI-TOF сегодня возможно создание генетического паспорта человека, что имеет большое практическое и научное значение.

Индивидуальный генетический паспорт дает возможность с высокой вероятностью прогнозировать развитие наследуемых патологий. Генотипирование SNP позволяет получить информацию о предрасположенности к наиболее распространенным заболеваниям:

- патологии свертываемости крови (тромбозы);
- невынашивание беременности и патология плода;
- онкологические заболевания (рак молочной железы, простаты, яичников, толстой кишки, легких);
- индивидуальная реакция на некоторые лекарственные препараты (варфарин, препараты химиотерапии);
- болезни обмена;

- нарушение липидного обмена;
- диабет и ожирение.

В связи с важностью этого вида исследований для предиктивной медицины, в России в дека-

бре 2014 г. Агентство стратегических инициатив (председатель наблюдательного совета Путин В.В.) одобрило программу по внедрению генетической диагностики.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний /Т.В. Припутневич, А.Р. Мелкумян, О.В. Бурменская и др. //Клин. микробиол. и антимикр. химиотерапия. – 2014. – № 1. – С. 4-9.
2. Кирилюк, А.А. Применение методов масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) в современной клинической лаборатории – обзор приложений, преимущества использования, современные подходы и возможности автоматизации /А.А. Кирилюк //Клин. лаб. диагностика. – 2014. – № 9. – С. 92-93.
3. Афанасьев, М.В. Апробация метода масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для идентификации возбудителей чумы /М.В. Афанасьев, А.С. Остяк, С.В. Балахонов //Клин. лаб. диагностика. – 2014. – № 8. – С. 39-43.
4. Применение масс-спектрометрического метода MALDI-TOF для межвидовой дифференциации близкородственных вибрионов /Н.Р. Телесманич, С.О. Чайка, С.Ю. Водяницкая и др. //Клин. лаб. диагностика. – 2014. – № 8. – С. 27-38.
5. Слободенюк, В.В. Индивидуальный или эмпирический подход в лечении бактериальных инфекций – куда ведут современные технологии? /В.В. Слободенюк //Клин. лаб. диагностика. – 2014. – № 9. – С. 20-21.
6. Основы разработки новых методов в клинической хирургии на основе газовой хроматографии и масс-спектрометрии /В.Г. Истратов, В.С. Демидова, А.А. Звягин и др. //Клин. лаб. диагностика. – 2013. – № 9. – С. 91-91.
7. Ускоренный способ идентификации возбудителей бактериемии с применением метода газовой хромато-масс-спектрометрии /Д.А. Попов, С.Т. Овсеенко, Г.А.Осипов и др. //Клин. лаб. диагностика. – 2013. – № 5. – С. 54-58.
8. Кишкун, А.А. Современные технологические возможности этиологической диагностики сепсиса /А.А. Кишкун //Клин. лаб. диагностика. – 2013. – № 9. – С. 58-59.
9. Назаров, А.П. Эффект полной автоматизации работы микробиологической лаборатории в условиях российского стационара /А.П. Назаров //Клин. лаб. диагностика. – 2014. – № 9. – С. 70-71.
10. Результативность применения масс-спектрометрии при автоматизации микробиологической диагностики /Л.Л. Корноухова //Клин. лаб. диагностика. – 2014. – № 9. – С. 73-73.