

<https://doi.org/10.17116/labs20187278-86>

Использование времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для идентификации бактериальных и грибковых возбудителей III—IV групп патогенности

И.В. ЧЕБОТАРЬ^{1,2*}, С.В. ПОЛИКАРПОВА³, Ю.А. БОЧАРОВА¹, Н.А. МАЯНСКИЙ¹

¹ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, Москва, Россия; ²НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения Москвы, Москва, Россия; ³ГБУЗ «Городская клиническая больница №15 им. О.М. Филатова» ДЗМ, Москва, Россия

Настоящие практические рекомендации включают описание одной из перспективных масс-спектрометрических технологий таксономической идентификации микроорганизмов III—IV групп патогенности, а именно, матрично-активированной лазерной десорбционно/ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии или MALDI-TOF MS (от англ. «*matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*»), и содержат перечень методических и организационных требований, соблюдение которых необходимо для корректного и безопасного выполнения этого диагностического метода.

Ключевые слова: микробиология, идентификация, диагностика, бактерии, микроскопические грибы, матрично-активированная лазерная десорбционно/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия.

Use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification of bacteria and fungi of the pathogenicity group III and IV

I.V. CHEBOTAR^{1,2*}, S.V. POLIKARPOVA³, YU.A. BOCHAROVA¹, N.A. MAYANSKY¹

¹National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russia; ²Clinical and Research Institute of Emergency Children's Surgery and Trauma, Moscow, Russia; ³Filatov Moscow City Clinical Hospital, Moscow, Russia

This document provides information on one of the promising technologies for taxonomic identification of microorganisms of the pathogenicity group III and IV, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), including methodological and organizational demands for correct and safe execution of this diagnostic method.

Keywords: microbiology, identification, diagnostics, bacteria, micromycetes, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry.

Болезни, ассоциированные с инфекционным процессом, составляют значительную часть в структуре заболеваемости и смертности [1]. Основой эффективных лечебно-профилактических мероприятий является быстрая и качественная микробиологическая диагностика, первым и важнейшим этапом которой является идентификация инфекционного агента. Существующие способы микробиологической диагностики, основанные на культивировании микробов на питательных средах, не всегда отвечают современным требованиям, предъявляемым к качеству медицинской помощи. Рутинные способы микробиологической диагностики достаточно информативны, но обладают серьезным недостатком — длительностью выполнения, которая может приводить к несвоевременной постановке диагноза

и задержке назначения антибактериальной терапии. Это увеличивает вероятность негативных исходов заболевания. Возникает необходимость внедрения новых диагностических технологий, которые могли бы обеспечить высокую скорость (не более нескольких часов), большую производительность, достаточную чувствительность и экономическую доступность клинико-микробиологического анализа.

Одной из самых перспективных технологий таксономической идентификации микроорганизмов является масс-спектрометрическое исследование [2, 3].

Настоящие практические рекомендации включают описание одной из перспективных масс-спектрометрических технологий, а именно, матрично-активированной лазерной десорбционно/иони-

зационной времяпролетной масс-спектрометрии или MALDI-TOF MS (от англ. «*m*atrix-*a*ssisted *l*aser *d*esorption *i*onization *m*ass *s*pectrometry»), и содержат перечень методических и организационных требований, соблюдение которых необходимо для корректного и безопасного выполнения данного диагностического метода.

1. Термины и определения

Для однозначного толкования настоящих практических рекомендаций используются следующие термины и определения:

Гемокультура — совокупность изолированных из крови микроорганизмов на/в питательной среде.

Идентификация в микробиологии — определение таксономической принадлежности изучаемого микроорганизма, проводимое на основании исследования его тинкториальных, морфологических, культуральных, биохимических, генетических, протеомных и других свойств.

Инфекционный агент — живые микроорганизмы, вызывающие патологический процесс в организме хозяина с определенным инкубационным периодом и выраженностью клинических проявлений в зависимости от степени патогенности.

Качество медицинской помощи — совокупность характеристик, отражающих своевременность оказания медицинской помощи, правильность выбора методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации при оказании медицинской помощи, степень достижения запланированного результата.

Масс-спектрометрия — метод исследования веществ, основанный на определении отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации компонентов пробы этого вещества.

Микробиологическая диагностика — совокупность методов, направленных на выявление и таксономическую идентификацию инфекционного агента, а также на оценку его патогенных (вирулентных) свойств, эпидемиологически значимых свойств и спектра чувствительности к антимикробным препаратам.

MALDI-TOF MS — матрично-активированная лазерная десорбционно/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия (от англ. «*m*atrix-*a*ssisted *l*aser *d*esorption *i*onization *m*ass *s*pectrometry»)

Score — статистический критерий, отражающий вероятность принадлежности MALDI-TOF MS-спектра исследуемого микроба к той или иной таксономической группе микроорганизмов.

2. Область применения и обоснование необходимости внедрения MALDI-TOF MS-идентификации микроорганизмов в практику клинической микробиологии

Настоящие практические рекомендации предназначены для специалистов лабораторий, осу-

ществляющих диагностические, мониторинговые и научные исследования с бактериальными и грибковыми возбудителями III—IV группы патогенности.

Настоящие практические рекомендации включают разделы, описывающие организацию, порядок и методики проведения работ по таксономической идентификации бактериальных и грибковых возбудителей III—IV группы патогенности, а также требования к аппаратам и реактивам, необходимым для проведения указанной идентификации.

Необходимость внедрения MALDI-TOF MS-идентификации микроорганизмов в практику клинической микробиологии определяется высокой диагностической эффективностью метода, экономической эффективностью, быстротой получения результатов идентификации и простотой выполнения процедуры.

3. Общая характеристика MALDI-TOF MS-идентификации микроорганизмов и организация лабораторных исследований

3.1. Общая характеристика метода

Масс-спектрометрический анализ (МС-анализ) является аналитической процедурой, направленной на измерение и регистрацию отношения массы заряженных частиц веществ (ионов) к их заряду. Полученный результат представляет спектр, отражающий наличие и количество отношений молекулярной массы ионов исследуемых веществ к их зарядам (m/z).

Настоящие практические рекомендации касаются применения наиболее важного для лабораторной диагностики метода масс-спектрометрии, основанного на матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (англ.: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) с времяпролетным разделением (англ.: Time of Flight, TOF) ионов (MALDI-TOF MS). Этот метод применяется в клинической микробиологии для идентификации микроорганизмов. MALDI-TOF MS — метод ионизации, позволяющий ионизировать биологические макромолекулы (пептиды, белки, ДНК, олигонуклеотиды, липополисахариды и др.) в присутствии особого вещества — матрицы — под воздействием лазера. Полученные ионы разделяются во времяпролетном анализаторе за счет разной скорости перемещения, обратно пропорциональной массе иона. На основании информации о пути перемещения иона от источника ионизации до детектора, а также о времени этого перемещения, вычисляется скорость движения иона и отношение массы к заряду (m/z) для каждого иона.

Использование в качестве исследуемого образца чистой культуры микроорганизма или его экстрактов позволяет получить спектр, специфичный для узких таксономических групп — рода, вида или

даже штамма. На основе характеристик полученного спектра при помощи программных биоинформатических инструментов осуществляется идентификация исследуемого микроорганизма в чистой культуре либо в смешанных культурах.

Процесс идентификации основан на сравнении полученных масс-спектров с референсными спектрами, присутствующими в базах данных, поставляемых производителями вместе с оборудованием для MALDI-TOF MS. При достаточном количестве совпадений делается вывод о таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов к конкретной таксономической группе. Результаты идентификации микроорганизмов с применением настоящих практических рекомендаций не требуют дополнительного подтверждения классическими биохимическими тестами.

3.2. Организация лабораторных исследований, обеспечение биологической безопасности

Работу с пробами материалов, содержащих возбудители III–IV группы патогенности бактериальной или грибковой природы, на MALDI-TOF масс-спектрометре выполняют в микробиологической лаборатории в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Пробы, явно или потенциально содержащие бактериальные и грибковые возбудители III–IV группы патогенности, готовят с учетом требований санитарных правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». MALDI-TOF масс-спектрометр должен быть установлен в «заразной» зоне. Средства индивидуальной защиты и тип дезинфицирующего раствора определяются в соответствии с действующими нормативными и методическими документами.

Каждое структурное подразделение (лаборатория), проводящее работы по индикации возбудителей опасных инфекционных болезней на MALDI-TOF масс-спектрометре, должно иметь санитарно-эпидемиологическое заключение о соответствии санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативам при проведении работ с возбудителями III–IV группы патогенности в соответствии с санитарными правилами СП 1.2.1318-03 «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I–IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами».

Исследования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии проводят в организациях, имею-

щих лицензию на право медицинской, ветеринарной, научной деятельности в областях, связанных с культивированием возбудителей III–IV группы патогенности. Помещение, в котором установлен MALDI-TOF спектрометр, должно быть оснащено системами вентиляции и с функциями поддержания заданной температуры в диапазоне 18–24 °С.

3.3. Требования к масс-спектрометру

Для исследования применяются масс-спектрометры, работающие на основе матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF MS) и прошедшие государственную регистрацию в Российской Федерации в качестве приборов медицинского назначения. Масс-спектрометр включает четыре компонента: источник ионов, систему разделения ионов, систему детекции ионов и управляющий компьютер. Источник ионов переводит исследуемый образец в ионизированную форму. Далее ионизированные компоненты образца оказываются в системе разделения ионов, которая ранжирует их по значению отношения массы иона к заряду. Детектор регистрирует образовавшиеся и рассортированные ионы, передает информацию о них на управляющий компьютер, позволяя генерировать визуальный спектр, на котором в виде пиков различной интенсивности представлены отношения массы иона к заряду всех ионизированных компонентов исследуемого образца. Управляющий компьютер масс-спектрометра должен содержать программное обеспечение, позволяющее обрабатывать цифровые характеристики полученных масс-спектров и на основе произведенной обработки достоверно определять таксономическую принадлежность микроорганизмов III–IV группы патогенности.

3.4. Требования к квалификации операторов

К выполнению подготовки проб и измерений методом масс-спектрометрии допускаются лица, прошедшие соответствующий курс обучения и освоившие настоящую методику выполнения измерений.

4. Порядок проведения, оценка результатов и контроль качества лабораторных исследований

4.1. Культивирование микроорганизмов

Идентификация возбудителей может производиться:

- 1) из культур микроорганизмов, полученных путем культивирования на искусственных питательных средах;
- 2) из образцов биоматериала, полученных непосредственно от пациента.

Получение культур микроорганизмов для проведения МС-идентификации производится на сле-

дующих селективных и неселективных питательных средах, разрешенных к применению в РФ в установленном порядке:

- «5% кровяной агар» (основа для кровяного агара с добавлением дефибрированной бараньей крови, крови крупного рогатого скота (КРС) либо лошадиной крови);
- сывороточный агар, сывороточный бульон;
- агар Мюллера—Хинтона, бульон Мюллера—Хинтона;
- сердечно-мозговой агар, сердечно-мозговой бульон;
- трипсинизированный соевый агар, трипсинизированный соевый бульон;
- желточно-солевой агар (ЖСА) или маннитол-солевой агар (МСА);
- Луриа-Бертани (ЛБ)агар (или лизогенный агар), ЛБ-бульон (или лизогенный бульон);
- агар Сабуро;
- бульоны, используемые для получения гемокультур.

Допускается исследование культур, полученных на других питательных средах, а также культур с микроорганизмами на разных фазах роста или выращенных при разных температурах. Наилучшие результаты получаются при использовании условий (среда, фаза роста, температура), идентичных тем, что были использованы для культивирования образцов, использованных для создания референсных записей базы данных.

Время культивирования микроорганизмов для проведения идентификации — от 6 ч до нескольких суток для медленно растущих микроорганизмов.

Проведение МС-анализа содержащихся в биологическом образце микроорганизмов возможно без предварительного культивирования, но с экстракцией из образца (кровь, моча, ликвор) микробных протеинов по методикам, описанным ниже (см. раздел 6.2). МС-анализ без предварительного культивирования возможен в тех случаях, когда в исследуемом объеме образца содержится достаточное количество микроорганизмов — не менее $5 \cdot 10^5$ бактерий, но не представителей типа *Actinobacteria*, или не менее 10^6 клеток грибов или бактерий из типа *Actinobacteria*.

Необходимо руководствоваться действующими нормативными правовыми и методическими документами, регламентирующими требования биологической безопасности при проведении работ с возбудителями инфекционных заболеваний, а также иными документами и внутренними инструкциями, разработанными и согласованными с органом по контролю соблюдения требований биологической безопасности учреждения, утвержденными руководителем, регламентирующими работу с бактериальными и грибковыми возбудителями III—IV группы патогенности.

4.2. Подготовка образцов для MALDI-TOF масс-спектрометрии

Алгоритм идентификации микроорганизмов на MALDI-TOF масс-спектрометре включает несколько необходимых этапов:

- нанесение материала, содержащего микробные белки, на специальную мишень, которая соответствует используемому типу MALDI-TOF масс-спектрометра;
- обработка нанесенного материала раствором матрицы — вещества, обеспечивающего включение микробных протеинов в свою структуру при высушивании, и лазер-индуцированное получение из этих протеинов ионизированных пептидов;
- установку мишени с обработанной матрицей микробным материалом в соответствующее устройство MALDI-TOF масс-спектрометра;
- внесение данных об источнике микробного материала (идентификационный номер и т.д.) в программу компьютера, управляющего MALDI-TOF масс-спектрометром;
- запуск измерения и биоинформатической обработки полученных масс-спектров, нацеленных на идентификацию таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов.

4.2.1. Прямое нанесение образцов на мишень

Прямое нанесение исследуемого материала на мишень применяется в тех случаях, когда в качестве материала непосредственно используются микробы III—IV группы патогенности из колоний, выросших на плотных или полужидких питательных средах, или микробная суспензия, полученная на жидких питательных средах. Лучшие результаты идентификации получаются в случае использования свежих чистых культур микроорганизмов, являющихся грамположительными или грамотрицательными бактериями, не принадлежащих к типу *Actinobacteria*.

Одну изолированную колонию возбудителя захватывают одноразовой микробиологической петлей и наносят на лунку мишени, равномерно распределяя ее по поверхности лунки и не выходя за ее края. Для каждой исследуемой единицы используют не менее 2—3 лунок для получения достоверного результата.

Сразу после высушивания нанесенной на мишень биомассы сверху наносят 1—2 мкл матрицы — альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты в водном растворе ацетонитрила и трифторуксусной (ТФУ) кислоты (вода — 19 частей, ацетонитрил — 20 частей, ТФУ-кислота — 1 часть), после чего высушивают на воздухе при комнатной температуре либо в потоке чистого воздуха или азота. В качестве матрицы и растворителя матрицы могут использоваться различные вещества и композиции веществ, рекомендованные производителями масс-спектрометров.

После окончания процедуры МС-идентификации мишени подвергаются дезинфекции согласно установленным в лаборатории правилам и в соответствии с нормативными документами.

4.2.2. Экстракция микробных белков из культурального материала и нанесение их на мишень

Данный метод применяют для идентификации некоторых представителей типа *Actinobacteria* (*Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Actinomyces* spp. и др.), спорообразующих бактерий, грибов, относящихся к возбудителям III—IV группы патогенности, а также во всех других случаях, когда при помощи прямого нанесения микробов на мишень не удается обеспечить достоверных результатов идентификации.

4.2.2.1. Экстракция микробных белков с использованием этанола и муравьиной кислоты

Данный метод применяют для уточнения таксономической принадлежности возбудителей инфекционных болезней III—IV группы патогенности в случаях, когда прямое нанесение образцов на мишень (п. 6.1.) не позволяет провести достоверную идентификацию изолированного микроорганизма.

Проведение экстракции:

1. Необходимо подготовить и промаркировать число пробирок (объемом 1,5 мл), соответствующее числу исследуемых штаммов.

2. В каждую пробирку вносят по 300 мкл деионизированной воды.

3. Микробиологической петлей диаметром 1 мм в пробирку вносят от одной колонии до нескольких изолированных колоний возбудителя и тщательно перемешивают (например, на лабораторной мешалке типа Vortex) либо пипетированием.

4. К суспензии добавляют 900 мкл 95% этилового спирта, тщательно перемешивают, затем центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин).

5. Супернатант полностью удаляют, осадок подсушивают при комнатной температуре 5—10 мин.

6. К осадку добавляют 20—50 мкл 70% водного раствора муравьиной кислоты, полученную смесь тщательно смешивают (объем муравьиной кислоты зависит от первоначального количества культуры, взятой в исследование, и может варьировать от 1 до 80 мкл).

7. К смеси добавляют эквивалентный объем ацетонитрила, затем перемешивают на вортексе и центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин).

8. Отбирают по 1,0 мкл супернатанта, который наносят на ячейку мишени (используют не менее 3 повторений для каждого образца).

9. Супернатант высушивают, на высушенные супернатанты наносят по 1,0 мкл матрицы — альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (см. п. 6.1.). Полученную смесь высушивают при комнатной температуре.

10. В качестве контроля используют калибровочный стандарт для масс-спектрометрии, позволяющий откалибровать MALDI-TOF масс-спектрометр в диапазоне от 2 000 до 20 000 Да и представляющий собой растворенный лиофилизат *E. coli* с внесением дополнительных белков. Калибровочный стандарт наносят на 2 отдельные ячейки мишени (по 1,0 мкл), после высыхания на калибровочный стандарт наносят по 1,0 мкл матрицы (альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты). После высушивания матрицы проводят калибровку прибора. Калибровочный стандарт может использоваться в качестве валидационного образца (тест-штамма), позволяющего проводить автоматическую перекалибровку прибора во время анализа группы образцов.

11. После калибровки прибора проводят масс-спектрометрические исследования и идентификацию возбудителей, присутствующих в образцах.

4.2.2.2. Экстракция микробных белков спорообразующих возбудителей инфекционных болезней III—IV группы патогенности с использованием ТФУ-кислоты

Данный метод применяют для идентификации спорообразующих возбудителей инфекционных болезней III—IV группы патогенности.

Протокол пробоподготовки:

1. Необходимо подготовить и промаркировать число пробирок (объемом 1,5 мл), соответствующее числу исследуемых штаммов.

2. В каждую пробирку вносят 300 мкл деионизированной воды.

3. Микробиологической петлей диаметром 1 мм в пробирку вносят одну изолированную колонию возбудителя, аккуратными, плавными движениями тщательно суспендируют.

4. Добавляют 50 мкл 80% ТФУ-кислоты, тщательно перемешивают.

5. Инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин.

6. Добавляют 150 мкл ультрачистой H_2O , тщательно перемешивают на вортексе, добавляют 200 мкл ацетонитрила, повторно тщательно перемешивают, затем центрифугируют (2 мин, 10 000 об/мин).

7. Отбирают по 1,0 мкл супернатанта, который наносят на ячейку мишени (используют не менее 3 повторений для каждого образца) и высушивают при комнатной температуре.

8. На высушенный образец наносят по 1,0 мкл матрицы — альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (см. п. 6.1.). Полученную смесь высушивают при комнатной температуре.

9. В качестве контроля используют калибровочный стандарт для масс-спектрометрии, позволяющий откалибровать MALDI-TOF масс-спектрометр в диапазоне от 2000 до 20 000 Да и представляющий собой растворенный лиофилизат *E. coli* с внесением

ем дополнительных белков. Калибровочный стандарт наносят на 2 отдельные ячейки мишени (по 1,0 мкл), после высыхания на калибровочный стандарт наносят по 1,0 мкл матрицы (альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты). После высушивания матрицы проводят калибровку прибора. Калибровочный стандарт может использоваться в качестве валидационного образца (тест-штамма), позволяет проводить автоматическую перекалибровку прибора во время анализа группы образцов.

10. После калибровки прибора проводят масс-спектрометрические исследования и идентификацию возбудителей, присутствующих в образцах.

*4.2.2.3. Экстракция микробных белков возбудителей инфекционных болезней III—IV группы патогенности, принадлежащих к роду *Mycobacterium*, с использованием ТФУ-кислоты*

Данный метод применяют для идентификации возбудителей инфекционных болезней III—IV группы патогенности, принадлежащих к роду *Mycobacterium*.

Протокол пробоподготовки:

1. Необходимо подготовить и промаркировать число пробирок (объемом 1,5 мл), соответствующее числу исследуемых штаммов.

2. В каждую пробирку вносят 1,0 мл 75% этанола.

3. Микробиологической петлей диаметром 1 мм в этанол вносят одну изолированную колонию возбудителя, аккуратно, плавными движениями тщательно суспендируют, материал перемешивают на вортексе, затем центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин), супернатант удаляют.

4. К полученному осадку добавляют 400 мкл ультрачистой H_2O , суспензию тщательно перемешивают на вортексе и термостатируют в твердотельном термостате 30 мин при $+95\text{ }^\circ\text{C}$.

5. Добавляют 1,0 мл охлажденного до $+4\text{--}8\text{ }^\circ\text{C}$ 95% этанола, суспензию тщательно перемешивают на вортексе, центрифугируют (2 мин, 10 000 об/мин), затем супернатант удаляют.

6. К осадку добавляют 20—50 мкл 70% муравьиной кислоты, суспензию тщательно перемешивают на вортексе в течение 1—2 мин.

7. К суспензии добавляют эквивалентное количество ацетонитрила, взвесь тщательно перемешивают на вортексе и центрифугируют (2 мин, 10 000 об/мин).

8. Отбирают по 1,0 мкл супернатанта, который наносят на ячейку мишени (используют не менее 3 повторений для каждого образца).

9. Супернатант высушивают, затем на него наносят по 1,0 мкл матрицы — альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (см. п. 6.1.). Матрицу высушивают.

10. В качестве контроля используют калибровочный стандарт для масс-спектрометрии, который наносят на 3 отдельные ячейки мишени (по 1,0 мкл),

после высыхания на калибровочный стандарт наносят по 1,0 мкл матрицы. Матрицу высушивают.

11. После калибровки прибора проводят масс-спектрометрические исследования и идентификацию возбудителей, присутствующих в образцах.

4.2.2.4. Экстракция микробных протеинов мицелиальных грибов-возбудителей инфекционных болезней III—IV группы патогенности

Данный метод применяют для таксономической идентификации мицелиальных грибов.

Протокол пробоподготовки:

1. Получают биомассу грибов в объеме, достаточном для экстракции протеинов, на основе которых возможно проведение масс-спектрометрической идентификации. Для этого производят засев чистой культуры гриба в пробирку с жидкой питательной средой (объем от 3,0 до 10,0 мл), способной обеспечить рост и размножение мицелиального гриба.

2. Культуру в пробирке инкубируют при температуре от 24 до 37 $^\circ\text{C}$ в зависимости от природы культуры мицелиального гриба при непрерывном вращении (на ротаторе) в течение 1 сут и более до появления видимого помутнения среды.

3. Культуру снимают с шейкера и дают отстояться в течение 10 мин.

4. Со дна пробирки отбирают 1,5 мл среды с придонным осадком и переносят в пробирку емкостью 1,5 мл, центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин), супернатант удаляют.

5. К осадку добавляют 1,0 мл ультрачистой H_2O , тщательно перемешивают на вортексе, центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин), супернатант удаляют. При необходимости процедуру можно повторить.

6. К осадку добавляют 300 мкл ультрачистой H_2O и 900 мкл абсолютного этилового спирта, тщательно перемешивают на вортексе, центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин).

7. Супернатант полностью удаляют, осадок подсушивают при комнатной температуре в течение 5—10 мин.

8. К осадку добавляют 10—50 мкл 70% водного раствора муравьиной кислоты, полученную смесь тщательно перемешивают на вортексе.

9. К суспензии добавляют эквивалентный объем ацетонитрила, суспензию перемешивают на вортексе и центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин).

10. Отбирается по 1,0 мкл супернатанта, который наносится на ячейку мишени (используется не менее 3 повторений для каждого образца).

11. Супернатант высушивают, на высушенный супернатант наносят по 1,0 мкл матрицы — альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (см. п. 6.1.). Матрицу высушивают.

12. В качестве контроля используется калибровочный стандарт для масс-спектрометрии, позволяющий откалибровать MALDI-TOF масс-

спектрометр в диапазоне от 2000 до 20 000 Да и представляющий собой растворенный лиофилизат *E. coli* с внесением дополнительных белков. Калибровочный стандарт наносят на 2 отдельные ячейки мишени (по 1,0 мкл), после высыхания на калибровочный стандарт наносят по 1,0 мкл матрицы (альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты). После высушивания матрицы проводят калибровку прибора. Калибровочный стандарт может использоваться в качестве валидационного образца (тест-штамма) и позволяет проводить автоматическую перекалибровку прибора во время анализа группы образцов.

13. После калибровки прибора проводят масс-спектрометрические исследования и идентификацию возбудителей, присутствующих в образцах.

4.2.2.5. Экстракция микробных протеинов возбудителей инфекционных болезней III—IV группы патогенности непосредственно из биологических образцов (крови, ликвора)

Данный метод применяют для ускорения постановки микробиологического диагноза бактериемии/фунгемии либо бактериального/грибкового менингита путем идентификации возбудителей инфекционных болезней III—IV групп патогенности непосредственно из крови/гемокультуры или ликвора. В качестве объекта исследования используется: 1) кровь или ликвор от пациента с признаками инфекции крови или менингита; 2) гемокультура с признаками микробного роста или засеянный на жидкую питательную среду ликвор с признаками микробного роста.

Протокол пробоподготовки:

1. В реакционную пробирку отбирают не менее 1,0 мл крови или ликвора, гемокультуры или культуры ликвора, материал центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин), супернатант удаляют.

2. К полученному осадку добавляют 1,0 мл ультрачистой H_2O , суспензию тщательно перемешивают на вортексе, центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин), супернатант удаляют.

3. К полученному осадку добавляют 1,0 мл 0,1% водного раствора додецилсульфата (лаурилсульфат) натрия, суспензию тщательно перемешивают, центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин), супернатант удаляют.

4. К полученному осадку добавляют 1,0 мл ультрачистой H_2O , суспензию тщательно перемешивают на вортексе, центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин), супернатант удаляют.

5. К полученному осадку добавляют 1,0 мл 70% этанола, суспензию тщательно перемешивают, центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин), супернатант полностью удаляют.

6. Осадок подсушивают при комнатной температуре 5—10 мин, к осадку добавляют 30—50 мкл

70% муравьиной кислоты, суспензию тщательно перемешивают на вортексе в течение 2 мин.

7. К суспензии добавляют ацетонитрил в объеме, эквивалентном объему муравьиной кислоты, добавленной в предыдущем пункте, суспензию тщательно перемешивают на вортексе, центрифугируют (2 мин, 13 000 об/мин).

8. Отбирают по 1,0 мкл супернатанта, который наносят на ячейку мишени (используют не менее 3 повторений для каждого образца).

9. Супернатанты высушивают, на высушенные супернатанты наносят по 1,0 мкл матрицы — альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (см. п. 6.1.). Матрицу высушивают.

10. В качестве контроля используют калибровочный стандарт для масс-спектрометрии, позволяющий откалибровать MALDI-TOF масс-спектрометр в диапазоне от 2000 до 20 000 Да и представляющий собой растворенный лиофилизат *E. coli* с внесением дополнительных белков. Калибровочный стандарт наносят на 2 отдельные ячейки мишени (по 1,0 мкл), после высыхания на калибровочный стандарт наносят по 1,0 мкл матрицы (альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты). После высушивания матрицы проводят калибровку прибора. Калибровочный стандарт может использоваться в качестве валидационного образца (тест-штамма) и позволяет проводить автоматическую перекалибровку прибора во время анализа группы образцов.

11. После калибровки прибора проводят масс-спектрометрические исследования и идентификацию возбудителей, присутствующих в образцах.

В качестве инструментов, стандартизирующих методику экстракции протеинов возбудителей инфекционных болезней III—IV группы патогенности непосредственно из крови, могут применяться коммерческие наборы реактивов MALDI Sepsityper Kit (производство «Bruker»), которые должны быть использованы в соответствии с инструкциями фирмы-изготовителя.

4.2.2.6. Экстракция микробных протеинов возбудителей инфекционных болезней III—IV группы патогенности непосредственно из мочи и нанесение их на мишень

Данный метод применяют для ускорения постановки микробиологического диагноза бактериурии, обусловленной возбудителями инфекционных болезней III—IV группы патогенности. В качестве объекта исследования используется моча. Метод является эффективным при концентрации микроорганизмов в моче, соответствующей не менее 10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл.

Протокол пробоподготовки:

1. Для проведения исследования отбирают не менее 4,0 мл мочи. Мочу центрифугируют (2 мин, 10 000 об/мин), супернатант удаляют.

Таблица 1. Степень достоверности полученных при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии результатов идентификации микроорганизмов

№	Диапазон Score	Описание
1	2000—3000	Высокая вероятность видовой идентификации
2	1700—1999	Надежная родовая идентификация, возможная видовая идентификация
3	0—1700	Ненадежная идентификация

2. К полученному осадку добавляют 1,5 мл ультрачистой H_2O , суспензию тщательно перемешивают на вортексе, переносят в пробирку объемом 1,5 мл, центрифугируют (2 мин, 10 000 об/мин), супернатант удаляют.

3. К полученному осадку добавляют 1,0 мл ультрачистой H_2O , суспензию тщательно перемешивают на вортексе, центрифугируют (2 мин, 10 000 об/мин), супернатант удаляют.

4. К полученному осадку добавляют 1,0 мл 70% этанола, суспензию тщательно перемешивают на вортексе, центрифугируют (2 мин, 10 000 об/мин), супернатант полностью удаляют.

5. Осадок подсушивают при комнатной температуре 5—10 мин, к осадку добавляют 30—50 мкл 70% муравьиной кислоты, суспензию тщательно перемешивают на вортексе в течение 2 мин.

6. К суспензии добавляют ацетонитрил в объеме, эквивалентном объему муравьиной кислоты, добавленной в предыдущем пункте, суспензию тщательно перемешивают на вортексе, центрифугируют (2 мин, 10 000 об/мин).

7. Отбирают по 1,0 мкл супернатанта, который наносят на ячейку мишени (используют не менее 3 повторений для каждого образца).

8. Высушивают, на высушенные супернатанты образцов наносят по 1,0 мкл матрицы — альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (см. п. 6.1). Матрицу высушивают.

9. В качестве контроля используется калибровочный стандарт для масс-спектрометрии, который наносят на 3 отдельные ячейки мишени (по 1,0 мкл), после высыхания на калибровочный стандарт наносят по 1,0 мкл матрицы. Матрицу высушивают.

10. После калибровки прибора проводят масс-спектрометрические исследования и идентификацию возбудителей, присутствующих в образцах.

4.3. Проведение MALDI-TOF масс-спектрометрии

Идентификацию проводят на масс-спектрометрах, соответствующих требованиям **Раздела 4** настоящих практических рекомендаций. Непосредственно перед процедурой идентификации следует установить мишень в соответствующий отсек масс-спектрометра и ввести в компьютерную программу, управляющую масс-спектрометром, данные об образцах, нанесенных на мишень. На первом этапе идентификации производят получение и накоп-

ление исходных спектров исследуемых образцов. Для получения достоверных результатов идентификации материал из каждого образца необходимо наносить не менее чем на 2—3 лунки мишени для MALDI-TOF масс-спектрометра. Для получения одиночного масс-спектра используют не менее 40 импульсов лазера (частота 60 Гц), анализируемый диапазон масса/заряд составляет 2000—20 000 Да. С каждой лунки снимается исходный спектр, представляющий собой сумму не менее шести одиночных спектров (240 импульсов лазера).

4.4. Учет и интерпретация результатов

С помощью программного обеспечения MALDI-TOF масс-спектрометра проводится автоматическая идентификация на основании сравнения собранных исходных спектров с референсными спектрами базы данных. Для определения вероятности идентификации задан логарифмический показатель — коэффициент соответствия Score, относительно значения которого и оценивают надежность и адекватность результатов. Чем выше коэффициент соответствия, тем вероятнее получение верного результата идентификации. Данные о результате идентификации исследуемого образца выводятся в виде отчета, включающего два наиболее близких микроорганизма и более детальную информацию о десяти других микроорганизмах, имеющих признаки сходства с масс-спектром исследуемого образца. Достоверность полученных результатов характеризуется значением от 0 до 3000, а также цветовым, символьным и буквенным обозначением, представленным в **табл. 1**.

Результат идентификации микроорганизмов, содержащихся в образце, записывается в журнал микробиологического исследования и/или вносится в компьютерно-информационную систему, хранящую информацию о лабораторных результатах. Отчет также сохраняется в базе программного обеспечения прибора.

4.5. Контроль качества результатов измерений

Периодичность контроля стабильности результатов измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

В зависимости от выбранной периодичности, но не реже 1 раза в месяц, проводится идентификация контрольных тест-штаммов микроорганизмов.

Таблица 2. Образец оформления журнала, в который должны заноситься полученные при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии результаты идентификации контрольных тест-штаммов

№	Дата проведения идентификации контрольного тест-штамма	Наименование контрольного тест-штамма	Результат	Подпись исполнителя
---	--	---------------------------------------	-----------	---------------------

Идентификация контрольных тест-штаммов для определения стабильности результатов проводится согласно п. 10.3 отдельно или одновременно с постановкой рабочих (исследуемых) образцов.

Результаты идентификации контрольных тест-штаммов фиксируются в отдельном журнале или графике (табл. 2).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). <http://ecdc.europa.eu> (Accessed September 2015).
2. Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Возможности, проблемы и перспективы масс-спектрометрических технологий в медицинской микробиологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;61(4):249-256. [Bocharova YuA, Chebotar IV, Mayanskii NA. The possibilities, problems and perspectives of mass-spectrometry in medical microbiology: publications review. *Klin Lab Diagnost*. 2016;61(4): 249-256. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-4-249-256>
3. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *Journal of microbiological methods*. 2017;138:20-29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>
4. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem*. 2015;61(1):100-110. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770>
5. Chen JH, Ho PL, Kwan GS, She KK, Siu GK, Cheng VC, Yuen KY, Yam WC. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization — time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol*. 2013;51(6):1733-1739. <https://doi.org/10.1128/JCM.03259-12>
6. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.02215-09>
7. Segawa S, Sawai S, Murata S, Nishimura M, Beppu M, Sogawa K, Watanabe M, Satoh M, Matsutani T, Kobayashi M, Iwade Y, Kuwabara S, Saeki N, Nomura F. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clin Chim Acta*. 2014;435:59-61. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.04.024>
8. Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013;51(3):828-834. <https://doi.org/10.1128/JCM.02852-12>

Поступила 06.03.18

Приложение

Нормативные документы

1. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации №85 от 30.04.03 «О введении в действие санитарно-эпидемиологических правил СП 1.2.1318-03 «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционной заболеваемости человека I—IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами».
2. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации №4 от 28.01.08 «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».