

«Масс-спектрометрия в практике бактериологической лаборатории - новые технологии и решения»

Основные методы идентификации микроорганизмов

- **Морфологические признаки**
- **Ферментативная активность:**
 - ручные методы
 - автоматизированные системы (Vitek, Walkaway, Phoenix)
- **ПЦР-тесты**
- **Секвенирование рибосомной РНК (16S рРНК)**
- **Хроматография метиловых эфиров жирных кислот**



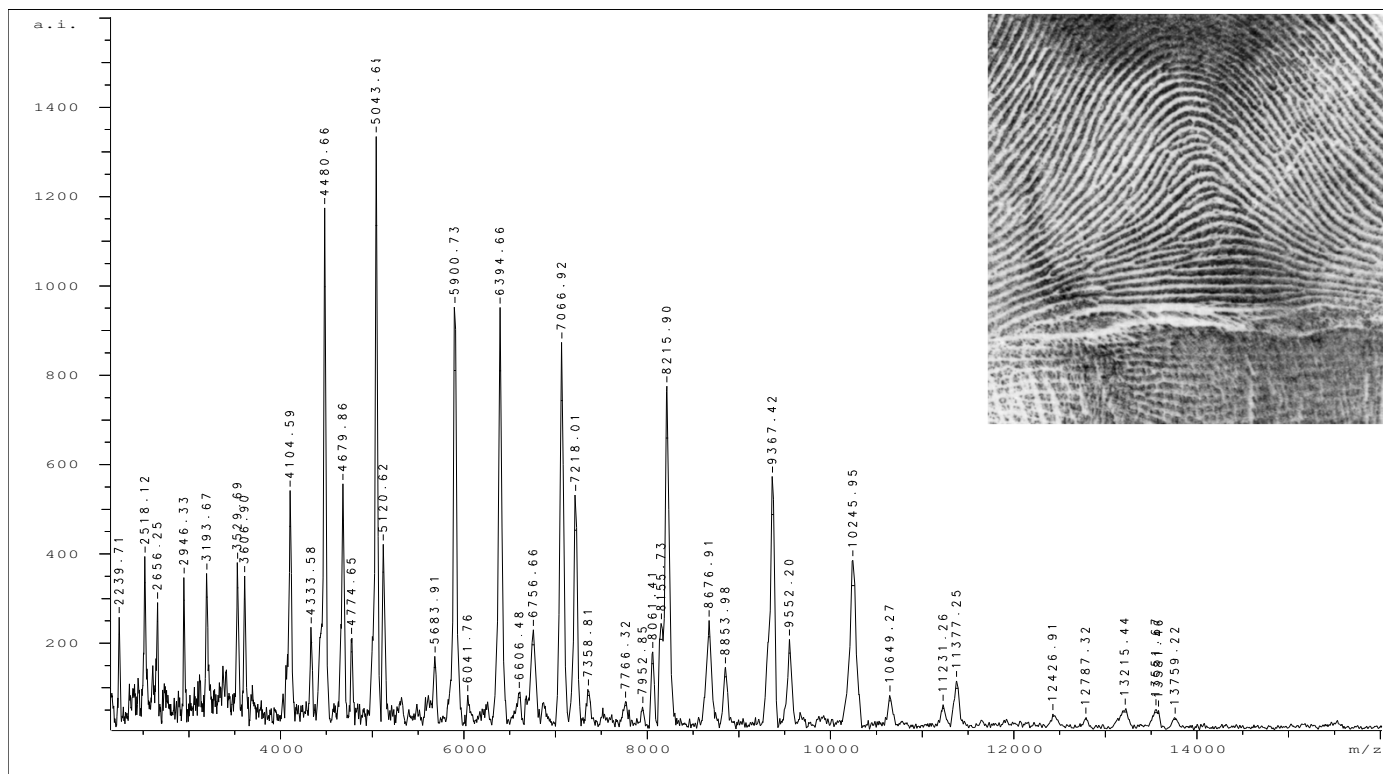
Биохимические методы идентификации микроорганизмов

- Требуют больших затрат времени
- Подвержены ошибкам
- Требуют значительных затрат на расходные материалы
- Связаны с большим объемом работы (ручные методы)

Новые технологии идентификации микроорганизмов

- Высокая точность и разрешающая способность
 - Широкий спектр идентифицируемых микроорганизмов
 - Высокая скорость
 - Высокая производительность
 - Низкая стоимость исследования
 - Надежность
 - Простота исполнения
 - Малое количество ручных процедур
-

Система MALDI-BioTyper



«Протеомная дактилоскопия» - Узнаем бактерию по «отпечаткам пальцев».....

надежный экспресс-метод идентификации микроорганизмов с минимальными

трудовыми и финансовыми затратами на пробоподготовку и анализ

- **Масс-спектрометрия** – аналитический метод измерения массы молекул или атомов анализируемого вещества (аналита)
- **Масс-спектрометр** – прибор, способный в условиях вакуума разделять находящиеся в газовой фазе заряженные частицы вещества согласно отношению их массы к заряду (m/z)

Общая схема масс-спектрометра



**MALDI- матрично -
ассоциированная
лазерная
десорбция-
ионизация**

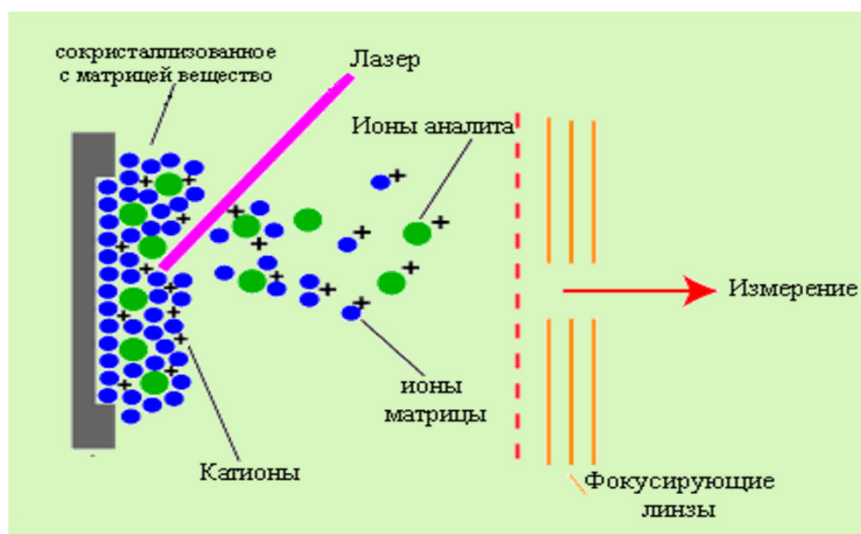
**TOF – (Time of
flight)
времяпролетный
анализатор**



Koichi Tanaka

Мягкая ионизация - MALDI

Матрично-Ассоциированная Лазерная Десорбция/Ионизация

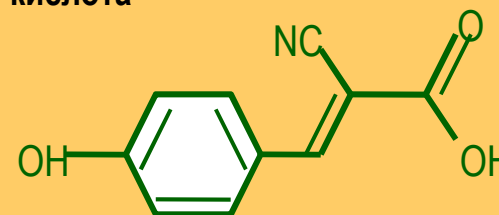


Сокристаллизованное
с матрицей вещество

МАТРИЦА:

- Поглощает энергию лазерного излучения
- “вскипая”, увлекает в газовую фазу молекулы аналита
- способствует ионизации

α – Циано-4-гидроксикоричная кислота



MALDI-TOF MS профиль – определение константных белков

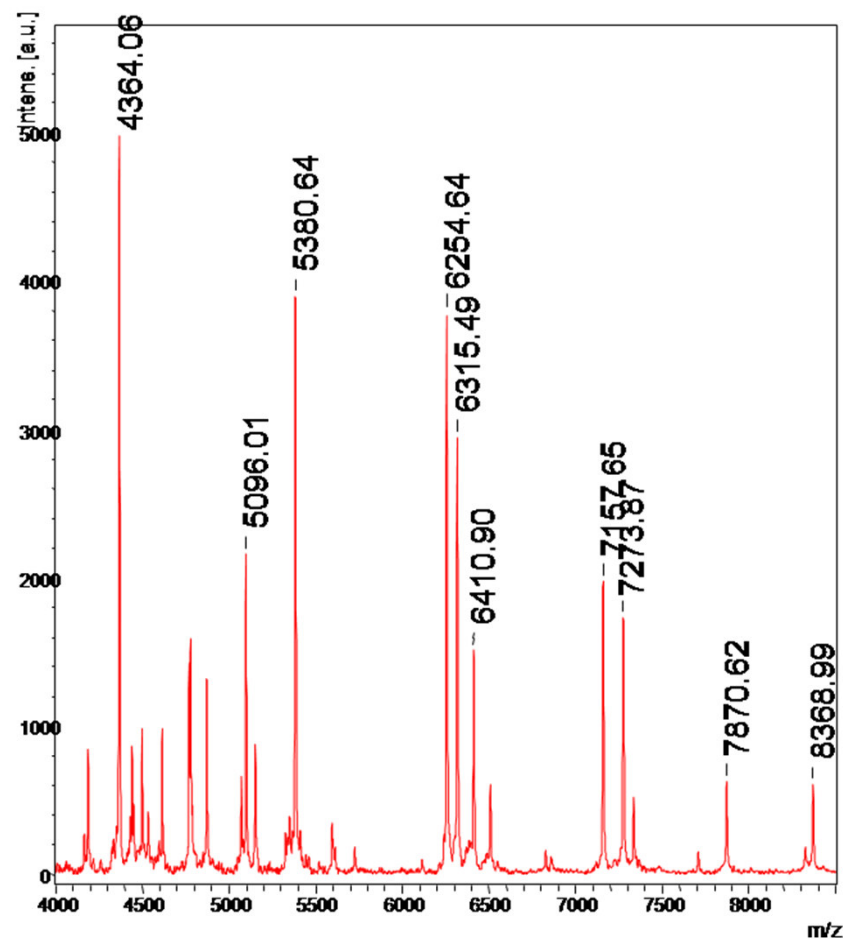
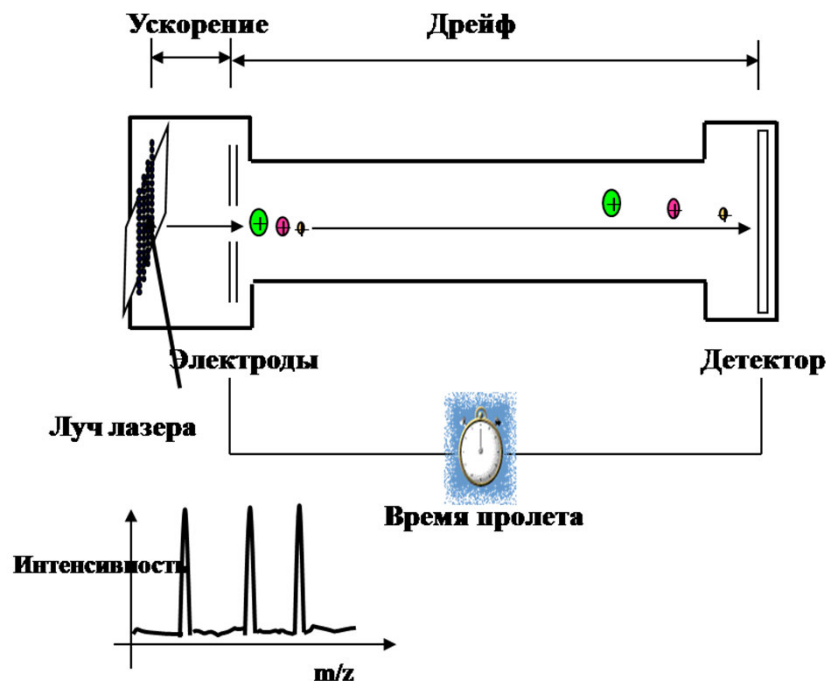


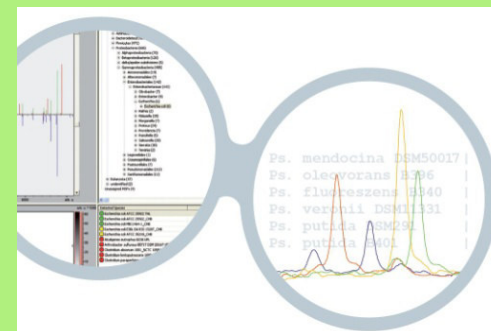
Схема исследования

MALDI-ToF

Пробоподготовка



Идентификация Biotyper



Характеристики исследования:

- Работа с первичными посевами
- Быстрая и простая пробоподготовка: 5 минут/образец
- Нет специальных расходных материалов (если не использовать такую опцию, как одноразовые мишени)
- Предел измерения 10^4 - 10^5 клеток $\sim$ 1 колония
- Скорость измерения: $\sim$ 1 мин / образец
- Передача результатов на ЛИС

От колонии до результата



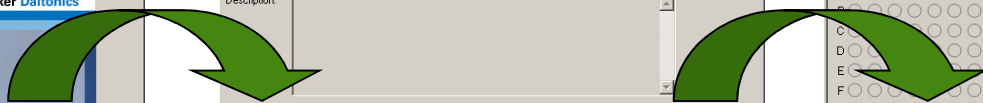
**Неизвестный
микроорганизм**



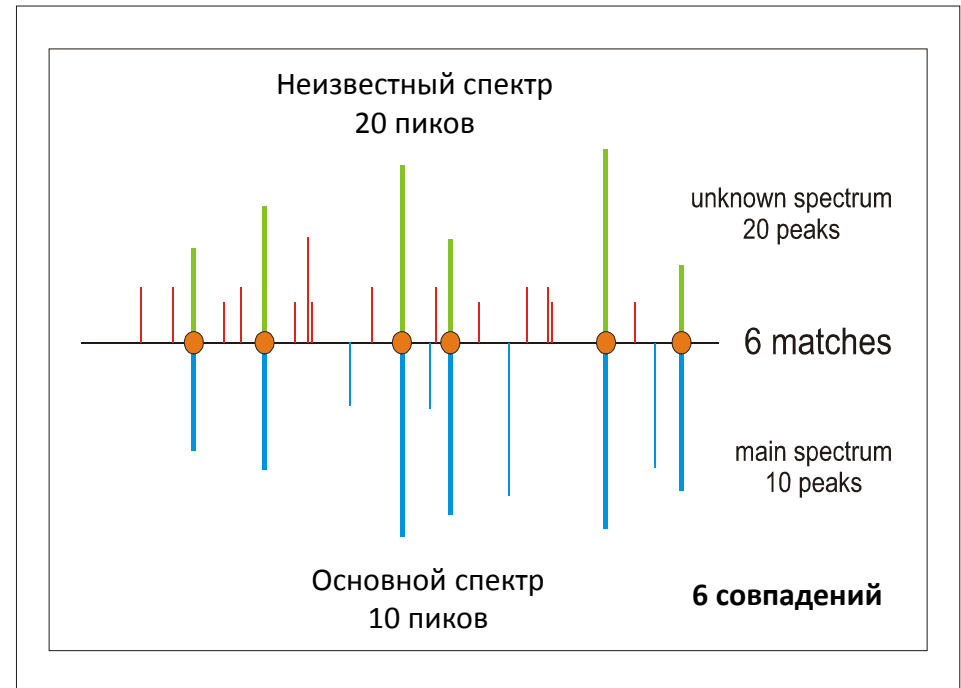
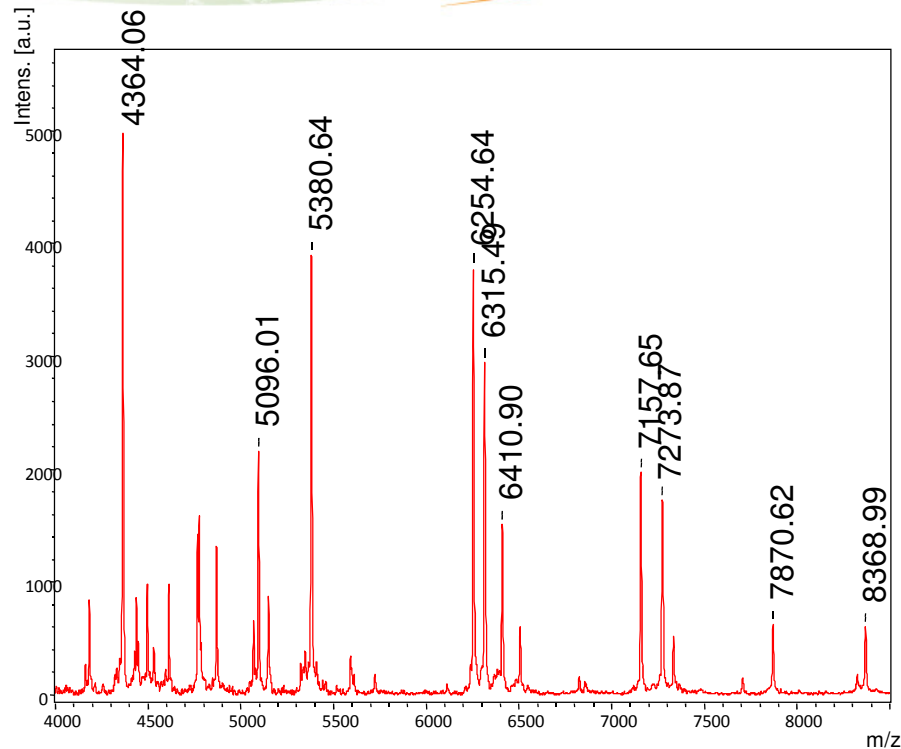
Нанесение образца



**Получение масс-
спектра**



MALDI Biotyper – Количественная оценка совпадения профилей



- **Неизвестный микроорганизм соотносится с основным спектром в библиотеке**
- **Сортировка по уровню совпадения**
- **Использование пороговой величины для идентификации**

Представление результатов

Classification Results



Project Info

Project Name: **My Project 312**
 Project Description: contains very urgent data
 Project Owner: kraeuter
 Project Creation Date/Time: 2007-02-23 13:12:35.203
 Project Analyte Count: 12

Analyte 1

Analyte Name: **A1**
 Analyte Description: measured at A1
 Analyte ID: XY00001-1
 Analyte Creation Date/Time: 2007-02-23 13:17:56.484

Match	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1	Acidiphilium acidophilum B349_UFL	2.527	76588
2	Pseudomonas lundensis DSM 6252T HAM	0.626	86185
3	Nocardia sp MB_9090_05 THL	0.408	1817
4	Enterococcus cloacae (PX) 22086116 I_MLD	0.407	550
5	Pseudomonas jessenii CIP 105274 HAM	0.383	77298
6	Escherichia coli ATCC 25922 THL	0.369	562
7	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 9295_1 CHB	0.358	72407
8	Pseudomonas abietaniphila CIP 106708 HAM	0.31	89065
9	Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi LMG 5011 HAM	0.306	29438
10	Pseudomonas rhodesiae DSM 14020T HAM	0.251	76760

Done
Trusted sites

MALDI Biotyper – развитие базы данных

Статус базы данных (БД) микроорганизмов Bruker на 05/2013:

Боле 4613 записей в БД (основных спектров/штаммов)

Более 2200 видов

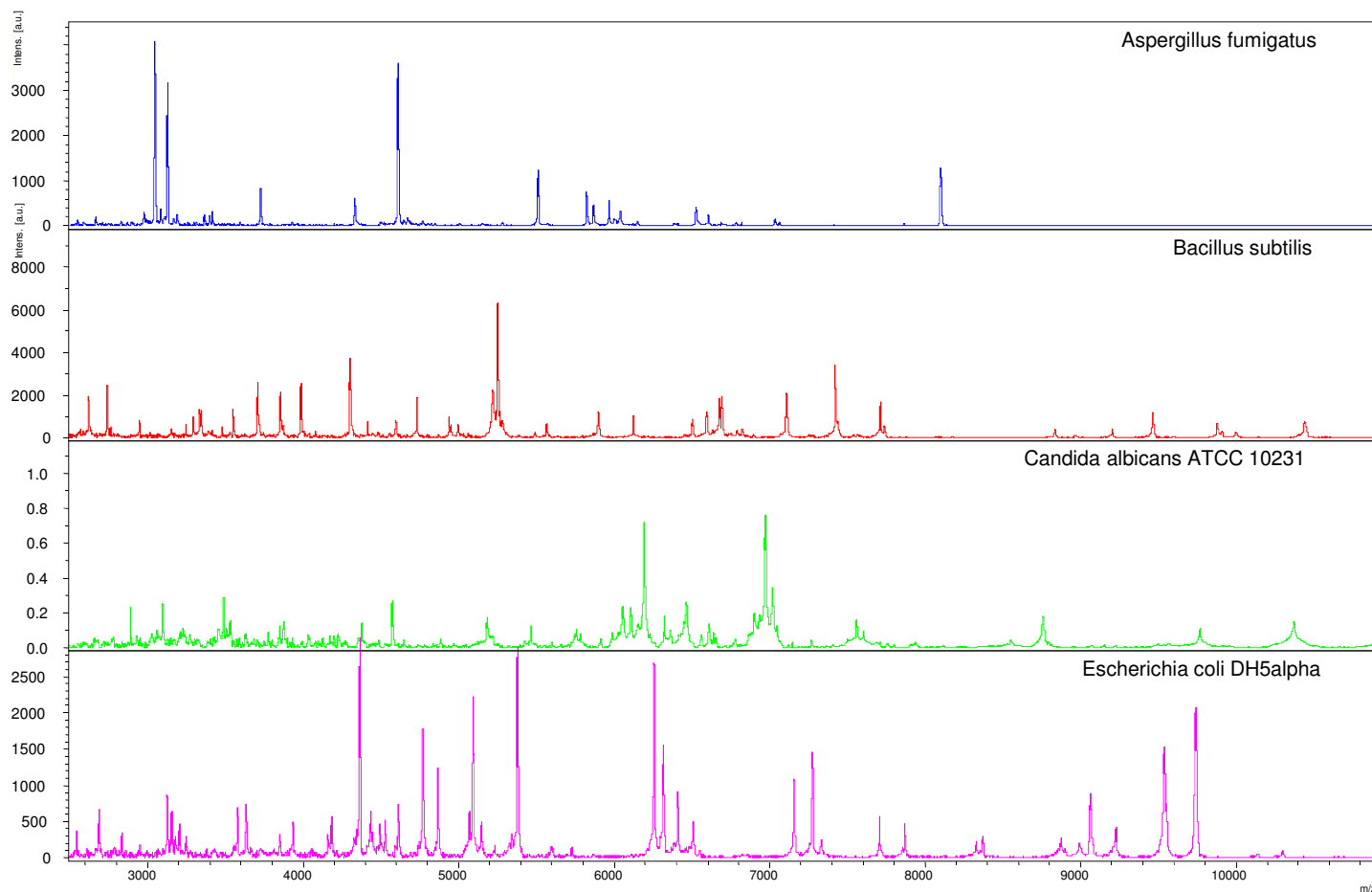
Более 360 родов

2013 – заключено соглашение о сотрудничестве с голландским институтом CBS - Dutch Fungal Biodiversity Center (100 тыс. штаммов микроорганизмов)

Очень высокая доля отсеквенированных, референтных, ТИПОВЫХ ШТАММОВ

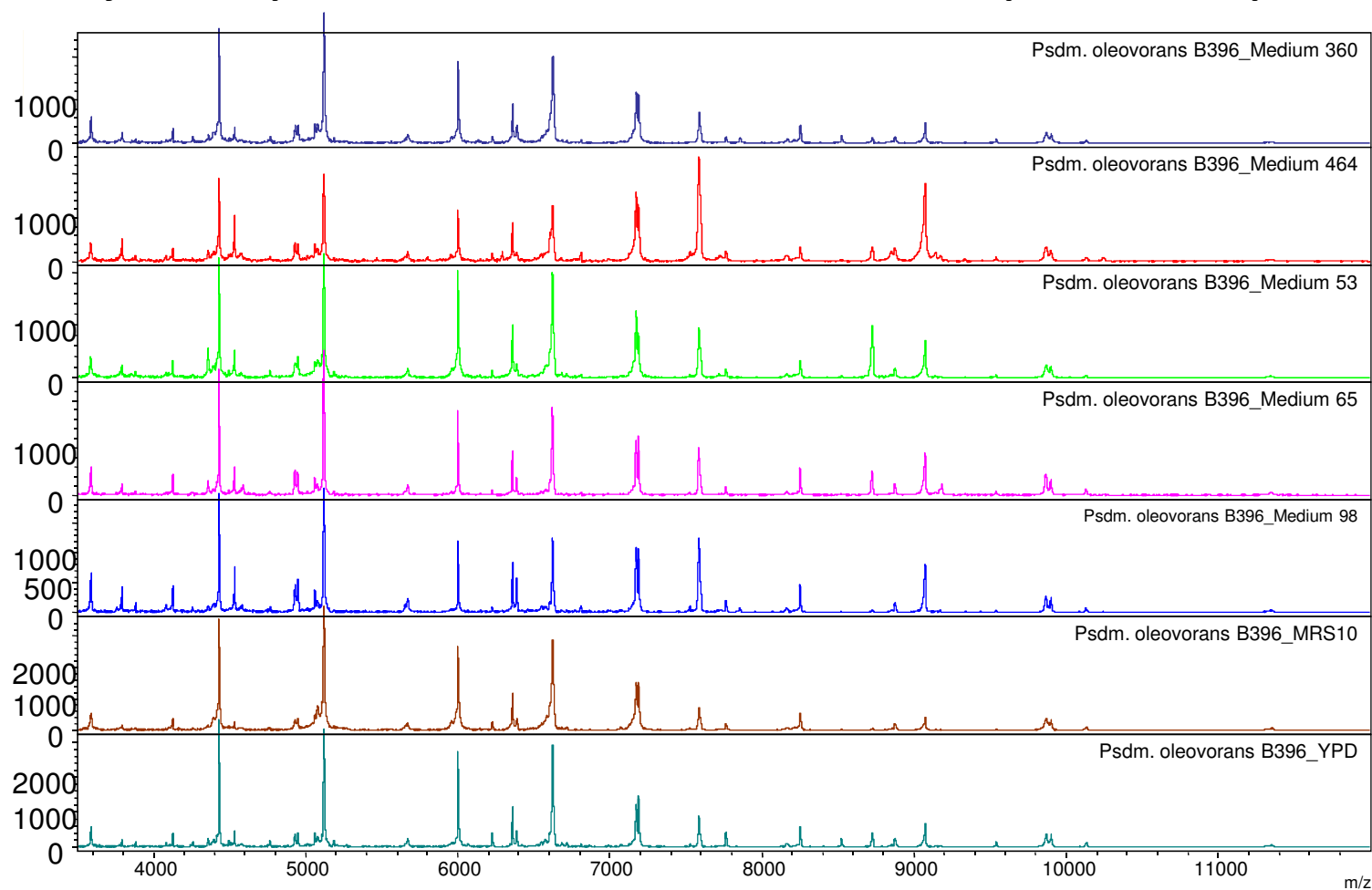
Широта применения метода

Мицелиальные грибы, дрожжи, Грам (+) и Грам (-) бактерии



Различные условия культивирования

Культивирование *Pseudomonas oleovorans* на различных средах



Лабораторная апробация

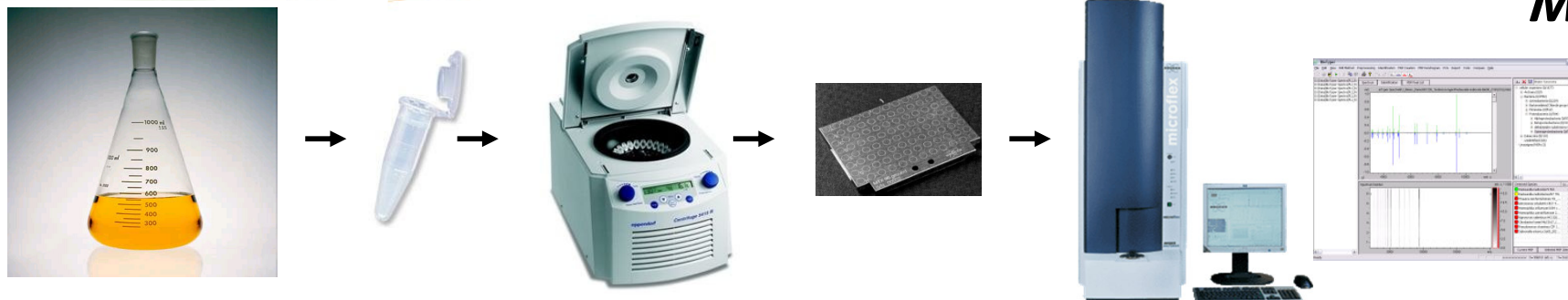
(совместно с сотрудниками межклинической бактериологической лаборатории ММА им. И.М.Сеченова)

- Проанализирован 831 посев. Идентификация проведена для 822 (99%).
(В 9 случаях скудный рост)
- Расхождение с бактериологическими данными в 37 случаях (4,5%)



В 35 случаях идентификация MS (BioTyper) подтверждена секвенированием 16S RNA. В 2х случаях секвенирование подтвердило бактериологическую идентификацию. Эффективность методики – 99,7%

MALDI Biotyper: прямое исследование мочи



1мл мочи:
центрифуг./отмывка
/центрифуг.

Экстракция
бактериального осадка,
нанесение на мишень,
добавление матрицы

MALDI анализ и
автоматическая
идентификация

Быстрая идентификация бактерий – возбудителей ИМП с помощью MALDI-TOF MS

G. Schwarz, T. Maier, M. Kostrzewa, C. Boogen, U. Weller

48th ICAAC/46th IDSA; Вашингтон, 25-28 октября **2008**

Идентификация бактерий непосредственно из мочи с помощью MALDI-TOF MS типирования

A. Borovskaya, E. Ilina, V. Govorun, O. Morozova, J. Ditmarova, A. Kruglov, T. Maier, M. Kostrzewa

19th ECCMID, Хельсинки, Финляндия, 16-19 мая **2009**

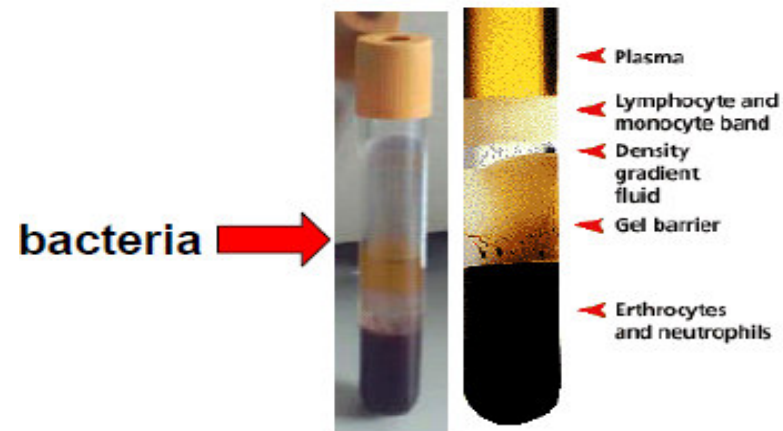
Прямая идентификация возбудителей из мочи

- Проанализировано 200 образцов
- Идентификация проведена для 188 образцов (94%)
- Совпадение результатов с бактериологической идентификацией в 179 случаях (95,2%)
- Расхождение данных в 9 случаях (4,8%):
 - в 4х случаях МС-идентификация подтверждена секвенированием
 - в 5 случаях проведена МС-идентификация, бактериологическое тестирование затруднено вследствие скудного роста микроорганизмов

Данные представлены на 19 Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям, 16-19 мая 2009

MALDI Biotyper: прямое исследование культур крови

- 2-4 мл положительной культуры центрифугировать
- Слой над гелем ресуспендировать в 1 мл dd H₂O
- Центрифугировать с низкой скоростью (3 мин)
- Перенести супернатант в новую пробирку Eppendorf
- Белковая экстракция
- Общее время выделения бактерий: ~20-30 мин



MALDI Biotyper: прямое исследование культур крови

	total (n=)	correct ID	not identified
<i>E. coli</i>	8	8	0
<i>Enterococcus faecium</i>	6	0	6
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	1	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2	0
<i>Pseudomonas oryzae</i>	1	1	0
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	1	0
<i>Rothia mucilaginosa</i>	1	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	13	1
<i>Staphylococcus capitis</i>	2	2	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	31	27	4
<i>Staphylococcus hominis</i>	5	4	1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	2	0
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	2	1	1
	80	65	15
%	100	81,3	18,8

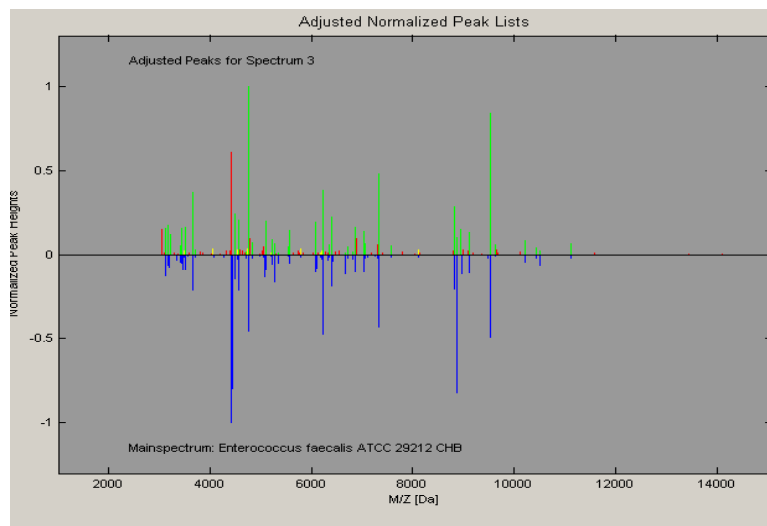
Schubert et al.

**Доклад на ECCMID 2010,
Вена:**

- >80% правильных идентификаций
- отсутствие ложноположительных результатов

MALDI Biotyper: анализ смешанных культур

Стандартный анализ

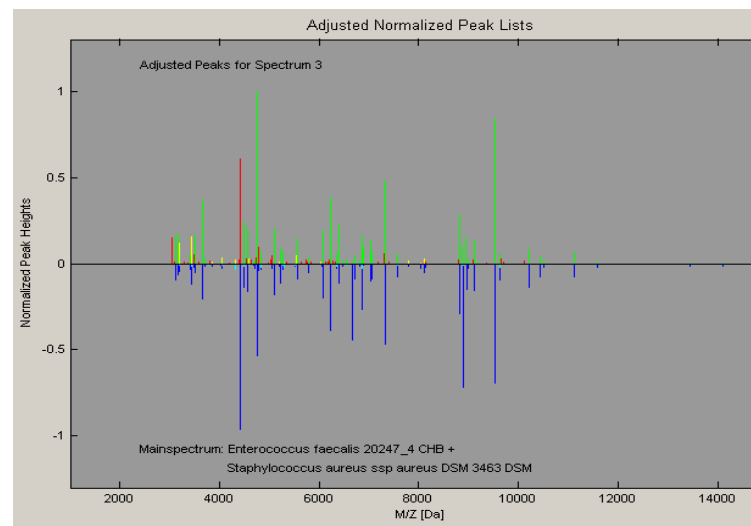


Результаты идентификации
Выявленные виды

log(Score)

Enterococcus faecalis	2.428
Staphylococcus aureus	1.492

Алгоритм для смешанных культур



Результаты идентификации
Выявленные виды

log(Score)

Enterococcus faecalis	2.742
Staphylococcus aureus	2.607

Масс-спектрометрическая идентификация чувствительности по деградации бактериальной клетки

Определение чувствительности грам(-) бактерий к β -лактамным антибиотикам

1. Инкубация суспензии бактериальных клеток с антибиотиком и энхансером
2. Детекция клеточной гибели масс-спектрометрическим измерением

Единовременное тестирование 6-ти образцов на чувствительность к защищенным ампициллинам, цефалоспорином 3-его поколения, карбапенемам

Разработка ООО НПФ Литех

Перспективы автоматизации пробоподготовки, компания **SCIROBOTICS** на базе Pickolo (TECAN)

PetriLab™

Robotic Microbiology Workstation



MALDI-TOF Spotting and Sample Preparation
using the Pickolo™ on Tecan robot



MALDI BioTyper Заключение:

- Минимальная пробоподготовка
 - Низкая стоимость определения
 - Быстрый и точный анализ, высокая производительность
 - Низкие требования к квалификации персонала
 - Постоянное расширение базы данных
 - Возможность добавления в базу данных своих спектров
 - Возможность прямого определения возбудителя
-

Наши пользователи

- Смоленский Медицинский Университет, НИИ Антимикробной химиотерапии, Смоленск
- ДГП №121, Москва
- НИИ Детских инфекций г.Санкт-Петербург
- Краевой НИИ Инфекционной патологии, Тюмень
- Иркутский Противочумный НИИ, Иркутск
- Лаборатория ИВИТРО, Москва
- Краевая клиническая больница им. Очаповского, Краснодар
- Детская Инфекционная больница, Петропавловск -Камчатский
- Костромская областная больница, Кострома
- Областной диагностический центр, Нижний Новгород
- Институт акушерства и гинекологии им. Отто, Санкт-Петербург
- Детская краевая клиническая больница, Красноярск

Спасибо за внимание!

1	Медико-генетический центр РАМН, Москва
2	Институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН, Москва
3	Научно-исследовательский Институт медицины труда РАМН, Москва
4	Центральный НИИ туберкулеза РАМН, Москва
5	ФГУ Государственный научный центр дерматовенерологии (Минздравсоцразвития), Москва
6	Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, НИИ Канцерогенеза, Москва
7	ФГУ "Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова", Москва
8	Северо-Западный центр доказательной медицины, С.Петербург
9	НИИ Физико-химической медицины ФМБА, Москва
10	НИЦ Охраны здоровья детей подростков и молодежи РАМН (НИИ Педиатрии), Москва
11	Смоленский Медицинский Университет, НИИ Антимикробной химиотерапии
12	Ростовский Противочумный НИИ
13	ДГП №121, Москва
14	Волгоградский Диагностический центр (частный)
15	Красноярск, ЦНИЛ Медицинского Университета
16	Новосибирск, Томографический центр
17	НИИ Детских инфекций г.Санкт-Петербург
18	Краевой НИИ Инфекционной патологии, Тюмень
19	Гор. Больница №2 , КМЛДО, Краснодар
20	Ставропольский Противочумный НИИ
21	Иркутский Противочумный НИИ

Закрытая система Vitek MS – решение от bioMérieux



Расходные материалы

VITEK MS

- 410893 Слайды для VITEK MS 32
- 411071 Матрикс для VITEK MS 5 x 0.5 мл
- 411072 Муравьиная кислота для VITEK MS 5 x 0.5 мл
- 411721 Силикагель для Vitek MS 500 г
- 411657 Набор для калибровки лазера 1
- 301090 LyfoCults Plus *E. faecalis* 19433 2
- 300953 LyfoCults Plus *C. glabrata* MYA-2950
- 301145 LyfoCults Plus *E. coli* 8739 2

MALDI BIOTYPER

- Ацетонитрил
- Муравьиная кислота
- Трифторуксусная кислота
- Матрица
- Bruker Daltonik - Бактериальный стандарт (контр. штамм).
- Набор «MALDI TOF проба», производства НПФ «Литех». Включает все необходимые для работы реагенты, РУ МЗ РФ – приобретается по желанию, как опция.

Некоторые технические характеристики: MALDI Biotyper vs Vitek MS

MALDI Biotyper

- **Мишени**

Мишени многоразовые. Промываются деионизированной водой и спиртом либо обрабатываются перекисью водорода.

- **Верхняя граница диапазона определяемых масс**

300 000 Da - Все бактериальные белки укладываются

в диапазон от **1000 до 20 000 Da**

- **Длина времяпролетной трубы (вакуумной трубки) - 1 м**

Длина трубки влияет только на разрешение отдельных пиков.

Незначительная разница в разрешении не влияет

на результаты идентификации

- **Ресурс лазера – не менее 60 млн. импульсов (вспышек)**

VITEK MS

- **Мишени**

Мишени только одноразовые. Несмотря на теоретическую возможность использования многоразовых мишеней, таких случаев не отмечено.

- **Верхняя граница диапазона определяемых масс**

500 000 Da

- **Длина времяпролетной трубы (вакуумной трубки) 1 м 20 см.**

- **Ресурс лазера – не менее 60 млн. импульсов (вспышек)**

На 96 образцов:

Этап	Процедура	Время, мин
Пробоподготовка	Нанесение образцов (прямое/после экстракции)	10
	Высыхание образцов	1-2
	Нанесение матрицы	1-2
	Высыхание матрицы	1-2
Анализ	Снятие спектров/идентификация (автоматически)	20-30

Исследование 96 образцов не превышает 1 часа!

	<u>Ручные биохимические тесты</u>	<u>Автоматический бактериологический анализатор Vitek</u>	<u>Масс-спектрометр Microflex</u>
<i>Klebsiella pneumonia</i>			
Стоимость идентификации 1 образца	141 руб.40 коп.	750 руб.	10 руб.
Время идентификации 1 образца	72 часа	54 часа	24 часа 10 минут
<i>Staphylococcus aureus</i>			
Стоимость идентификации 1 образца	110 руб. 20 коп.	750 руб.	10 руб.
Время идентификации 1 образца	72 часа	54 часа	24 часа 10 минут



научно-производственная фирма

Расход реактивов

На 1000 образцов:

Реактив	Прямое нанесение	Нанесение после экстракции этанолом/муравьиной кислотой	Экстракция спорообразующих
Раствор матрицы	1 мл	1 мл	1 мл
HCOOH		50 мл	
C ₂ H ₅ OH		800 мл	
CH ₃ CN		50 мл	200 мл
ddH ₂ O		300 мл	150 мл
ТФУ			50 мл

Система идентификации микроорганизмов Axima @SARAM

Firefox

Диазм : Лабораторное оборудование : Ма... +

www.dia-m.ru/lab/mass-spektrometry/shimadzu-aximasaramis-mass-s Я Яндекс

Система идентификации микроорганизмов **Axima @SARAMIS** — это экспертная система идентификации микроорганизмов **SARAMIS** (Spectral Archive And Microbial Identification System) на базе времяпролетного масс-спектрометра (MALDI-TOF), серии **Axima, Shimadzu**, предназначенного для анализа макромалекул.

Преимущества метода:

- достоверный результат за две минуты;
- заменяет стандартные биохимические методы;
- высокая воспроизводимость результатов анализа;
- значительная экономия средств и времени;
- единый протокол проведения анализа для любых микроорганизмов.

Области применения:

- диагностика инфекционных заболеваний человека и животных;
- фундаментальные научные исследования в области биологии микроорганизмов;
- фармацевтические исследования в области анализа и сравнения белковых профилей бактериальных штаммов, устойчивых к лекарствам, поиск новых мишеней фармакологического воздействия препаратов;
- сравнение, классификация и стандартизация микробиологических коллекций штаммов микроорганизмов;
- анализ присутствия желательных и нежелательных микроорганизмов на ранних стадиях пищевых производств.



Сравнение методов идентификации

Все 1660 проанализированных изолята получены из образцов крови, СМЖ, гноя, биопсий, ран, фекалий, отделяемого дыхательного тракта

Метод	Затраченное время	Стоимость, €	Уровень подготовки персонала
Ручной		Цены дек. 2008	
Окраска по Граму	6 мин	0,6	От среднего до высокого
Система идентификации API (bioMerieux)	18 - 48 ч	4,6 - 6,0	Средний
Определение устойчивости к антибиотикам	18 - 48 ч	6,6 - 7,4	Средний
Phoenix - система идентификации и определения чувствительности к антибиотикам (BD Diagnostics)	5 - 20 ч	12,65	Средний
Система Vitek (bioMerieux)			
идентификация	5 - 8 ч	5,9 - 8,23	Средний
идентификация и определение чувствительности к антибиотикам	5 - 8 ч	10,38 -12,71	
MALDI-TOF	6 - 8,5 мин	1,43	От низкого до среднего

Системы секвенирования “Нового поколения”



HiSeq 2000



SOLiD™ 4hq



FLX Titanium

Системы, обеспечивающие высокую скорость и производительность

Преимущества методов ДНК-секвенирования: возможность анализа без предварительного культивирования, детекция генов резистентности, высокое разрешение

Низкая стоимость в пересчете на одну пару нуклеотидов,

— но очень высокая стоимость в пересчете на геном каждого микроорганизма

Секвенирование полного генома — новые возможности для исследования микроорганизмов и проведения детального анализа

Не для рутинной идентификации микроорганизмов (пока)

Схема метода обнаружения мутаций

- маркерной устойчивости

научно-производственная фирма
Линекс



Исследуемый материал:
мокрота,
биологические жидкости,
культура
микроорганизма, т.д.



ПЦР (для накопления гена,
несущего маркерную мутацию)

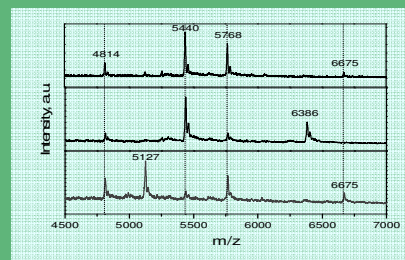


Реакция
минисиквенирования



MALDI-ToF масс-спектрометрия
продуктов реакции
минисиквенирования

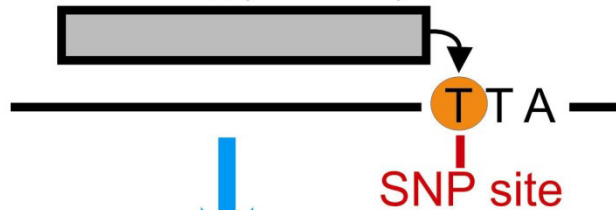
Получение масс-профилей



Анализ масс-спектра
и вывод о наличии
мутации, приводящей к
лекарственной
УСТОЙЧИВОСТИ
микроорганизма

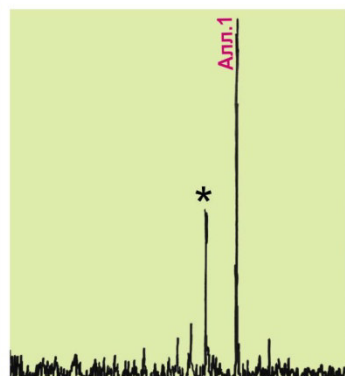
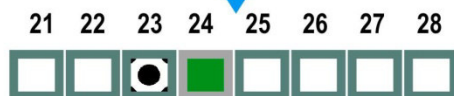
Аллель 1

SNP-зонд (23 звена)



+ДНК полимераза
+ ddTTP
+ dCTP

Достроенный SNP-зонд (24 звена)



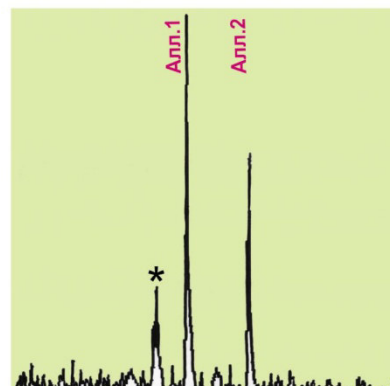
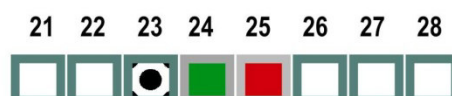
Аллель 1
Гомозигота T/T

Аллель 2

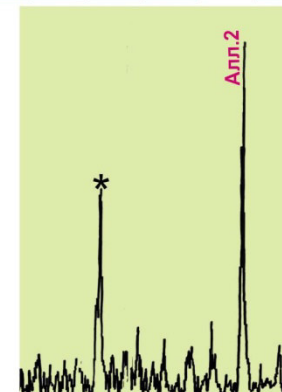
SNP-зонд (23 звена)



Достроенный SNP-зонд (25 звеньев)



Аллель 1/2
Гетерозигота T/C

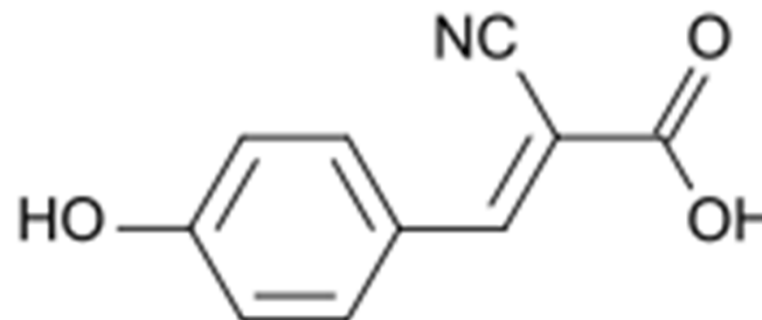


Аллель 2
Гомозигота C/C

Матрица

- Способствует ионизации макромолекул
- «Вскипая», увлекает аналит в газовую фазу

α -циано-4-гидроксикоричная кислота (CHCA)



Приготовление раствора матрицы:

- Основной органический растворитель (OS): 25% TFA/50% CH_3CN
- Растворить 10 мг матрицы в 1 мл OS

На 1 образец требуется 1 мкл (!) матрицы



Варианты подключения системы MALDI Biotyper к автоматическим бак.анализаторам



CGM Analytix

CGM Analytix

BD EpiCenter™



bioMérieux:

Vitek 2

Vitek 2 Compact

Bact Alert



Becton Dickinson:

BD Phoenix™

Bactec

Достоинства MALDI-TOF MS

Исходный материал:

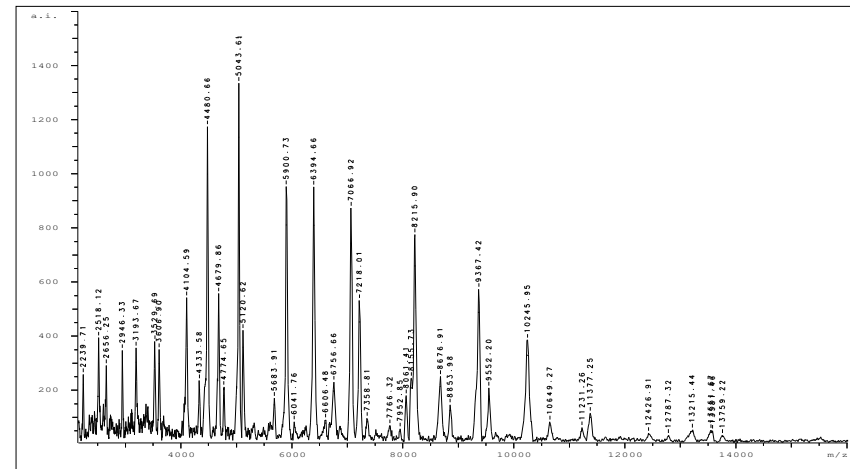
- Необходим только первичный посев
- Широкий выбор сред и условий культивирования
- Возможность прямого анализа материала без предварительного посева

Пробоподготовка:

- Не требует высокой квалификации
- Минимальное количество расходных материалов

Идентификация:

- Мало ручных процедур
- Идентификация смеси из 2х микроорганизмов
- Идентификация 1 образца <10 мин, 96 образцов - 1 час
- Достоверность, близкая к секвенированию гена 16S РНК



Масс-спектрометрическое определение



Инкубация суспензии
бактериальной культуры

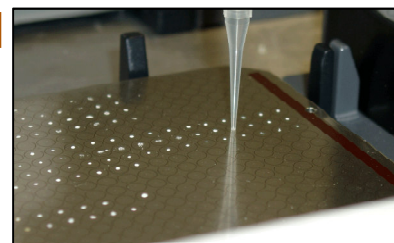
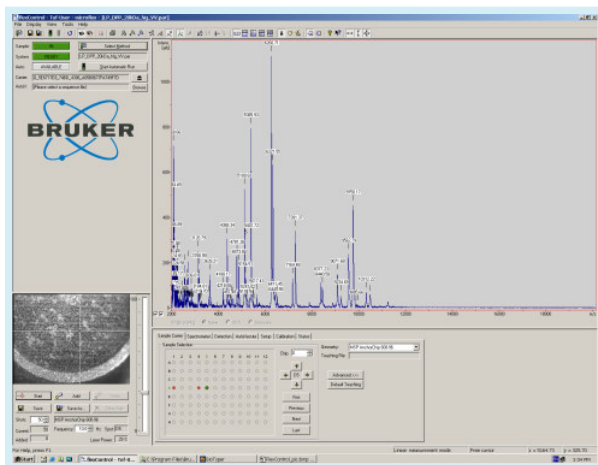


Супернатант бактериальной
культуры

96% этанол
-20°C

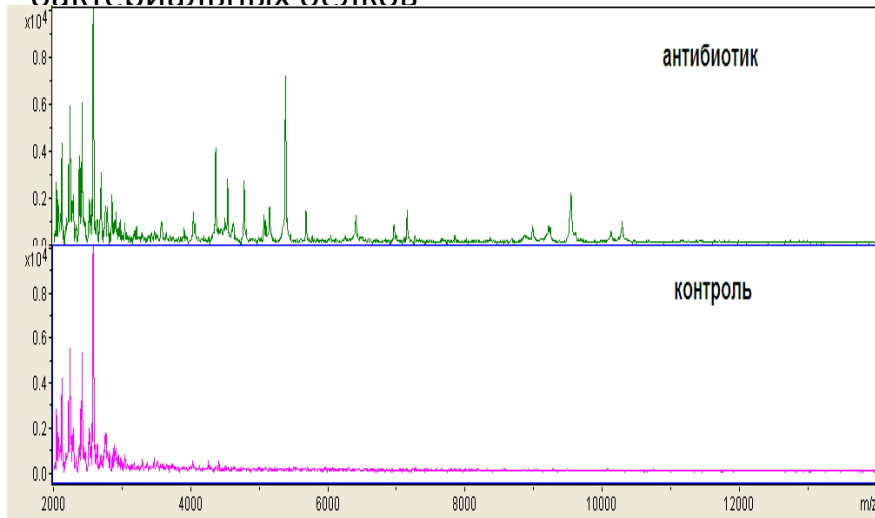
центрифугирование

Осадок в
70% муравьиной кислоте/ацетонитриле

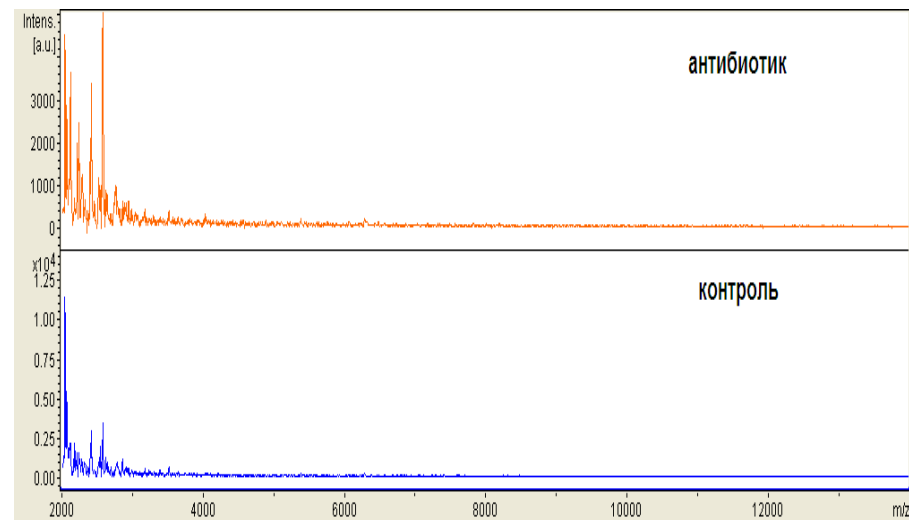


Детекция клеточной смерти с помощью MALDI масс-спектрометрии

Если бактерия чувствительна к антибиотику, происходит лизис клетки, и белки оказываются в супернатанте. На спектре присутствуют пики бактериальных белков



Если бактерия устойчива к антибиотику, клеточного лизиса не происходит. В спектре пиков нет



В обоих случаях отсутствует деградация бактериальной клетки в контрольном образце, куда не добавляется антибиотик

- Получение результатов через 5 часов
- Возможность идентификации бактерии в процессе оценки чувствительности
- Простота манипуляций
- Невысокая себестоимость
- Простота интерпретации результатов