

Перевод.

Оригинальная статья: Aure'lie Lotz, Agne`s Ferroni, Jean-Luc Beretti, Brunhilde Dauphin, Etienne Carbonnelle, He'le`ne Guet-Revillet, Nicolas Veziris, Be'ate Heym, Vincent Jarlier, Jean-Louis Gaillard, Catherine Pierre-Audigier, Eric Frapy, Patrick Berche, Xavier Nassif, and Emmanuelle Bille. Rapid Identification of Mycobacterial Whole Cells in Solid and Liquid Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2010 Vol. 48, No. 12, p. 4481–4486 doi:10.1128/JCM.01397-10

Быстрая идентификация микобактерий в виде цельных клеток на плотной и жидкой питательных средах с помощью МАЛДИ-ТОФ масс-спектрометрии

Aure'lie Lotz,^{1,2} Agne`s Ferroni,^{1*} Jean-Luc Beretti,¹ Brunhilde Dauphin,³ Etienne Carbonnelle,⁴ He'le`ne Guet-Revillet,^{1,2} Nicolas Veziris,⁵ Be'ate Heym,⁶ Vincent Jarlier,⁵ Jean-Louis Gaillard,⁶ Catherine Pierre-Audigier,⁷ Eric Frapy,² Patrick Berche,^{1,2} Xavier Nassif,^{1,2} and Emmanuelle Bille^{1,2}

Assistance Publique-Ho`pitaux de Paris, Laboratoire de Microbiologie, Ho`pital Necker-Enfants Malades, Paris, France¹; Universite' Paris 5 Descartes, Faculte' de Me'decine, Site Necker, Paris, France²; Andromas SAS, 156 rue de Vaugirard, Paris, France³; Assistance Publique-Ho`pitaux de Paris, Laboratoire de Microbiologie, Ho`pital Europe'en Georges Pompidou, Paris, France⁴; Assistance Publique-Ho`pitaux de Paris, National Reference Center for Mycobacteria, Ho`pital Pitie'-Salpe'trie`re, Paris, France⁵; Assistance Publique-Ho`pitaux de Paris, Laboratoire de Microbiologie, Ho`pital Ambroise Pare', Boulogne-Billancourt, France⁶; and Assistance Publique-Ho`pitaux de Paris, Laboratoire de Microbiologie, Ho`pital Bichat-Claude Bernard, Paris, France⁷

Идентификация микобактерий основана на нескольких подходах: традиционные биохимические тесты, требующие нескольких недель для точной идентификации, и молекулярные методы, широко используемые в настоящее время. Однако эти подходы являются дорогостоящими и трудоемкими. В этом исследовании был разработан альтернативный метод с использованием МАЛДИ-ТОФ масс-спектрометрии. Такой подход позволяет получить характерные масс-спектральные «отпечатки пальцев» из цельных инактивированных клеток микобактерий. Мы разработали стратегию, основанную на специфических профилях, чтобы определить наиболее клинически значимые виды микобактерий. Для валидации базы данных микобактерий были проанализированы в общей сложности 311 штаммов, принадлежащих 31 различным видам и 4 видовым комплексам, выращенным на среде Левенштейна-Йенсена (LJ) и жидкой среде (в пробирках с индикатором роста микобактерий [MGIT]). Этап экстракции не требовался. Были получены правильные данные идентификации для 97% штаммов на среде LJ и 77% штаммов из среды MGIT. Не было отмечено случаев ошибочной идентификации. Наши результаты, основанные на очень простом протоколе, предполагают, что эта система может дать клиническим лабораториям подходящий альтернативный метод для видовой идентификации микобактерий.

Род *Mycobacterium* охватывает более 100 видов. Наиболее важные микобактериальные инфекции преимущественно вызваны комплексом *Mycobacterium tuberculosis*. За последние несколько лет, в связи с увеличением числа лиц с ослабленным иммунитетом, растет заболеваемость другими микобактериальными инфекциями, вызванными нетуберкулезными микобактериями (NTM) (1). Поскольку схема лечения этих инфекций зависит от изолированных видов-возбудителей, необходима правильная и быстрая идентификация возбудителей.

Традиционные методы идентификации микобактерий классически основаны на биохимических тестах. Они требуют несколько недель для адекватного роста, и иногда точная идентификация с их помощью невозможна. Такие трудности, как отсутствие адекватной воспроизводимости, изменчивость фенотипов и тот факт, что информация о фенотипе ограничена обычными видами, могут привести к неоднозначным или ошибочным результатам (29). В последние десятилетия с использованием инструментов молекулярной биологии были разработаны новые стратегии (6, 10, 16, 24). Методы, основанные на гибридизации ДНК, чувствительны, быстры и просты, но доступные коммерческие анализы (AccuProbe, Gen-Probe, San Diego, CA) способны идентифицировать только четыре вида и два комплекса микобактерий (10). Методы, использующие

амплификацию с последующей стадией гибридизации на твердой подложке, обеспечивают более полное выявление видов, чем методы, использующие зонды, но коммерчески доступные наборы ограничены 5-ю (Geno-Type MTBC, Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), 16-ю (Inno-LiPa Mycobacteria v2; Innogenetics, Гент, Бельгия) или 30-ю (GenoType Mycobacterium; Hain Lifescience GmbH, Германия) видами (19, 22, 30). Системы, основанные на секвенировании или рестрикционном анализе генов *hsp65*, 16S рРНК, *sod* и *groB*, позволяют хорошо идентифицировать все микобактерии на уровне видов, но их применение остается ограниченным отдельными специализированными лабораториями (14, 17, 23, 31, 36, 37). Кроме того, они являются дорогостоящими и требуют для выполнения большого количества времени и высокой квалификации операторов (20). В последнее время были предложены альтернативы, основанные на анализе миколовых кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (2) или тандемной масс-спектрометрии с электроспрейной ионизацией (28). Однако эти методы также являются трудоемкими. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация - времяпролетная масс-спектрометрия (МАЛДИ-ТОФ МС) позволяет быстро идентифицировать наиболее часто выделяемые бактерии, выращенные на плотной среде, путем идентификации видоспецифичных профилей, полученных из изолированных колоний (3-5). Этот метод в настоящее время стандартно используется в нескольких лабораториях (26, 34). Некоторые авторы использовали МАЛДИ-ТОФ МС для быстрой идентификации видов *Mycobacterium* (12, 18, 21). Однако использованные методы требуют нескольких этапов, таких как методы, основанные на анализе гена 16S рРНК (18), выделение клеток (12) или статистический анализ (12, 21). Кроме того, количество тестируемых штаммов в этих исследованиях составляет менее 40, включая максимум 13 видов. Hettick и др. впервые показали, что анализ целых клеток микобактерий с помощью МАЛДИ-ТОФ МС может быть использован для идентификации. Однако ограниченное количество штаммов препятствовало разработке пригодной для использования базы данных (11).

Недавно мы разработали стратегию выявления бактерий с использованием МАЛДИ-ТОФ МС на основе выбора ограниченного числа профилей вида (3, 5). Цель настоящей работы - распространить эту стратегию на идентификацию штаммов микобактерий без экстракции клеток. Этот метод позволит нам иметь быстрый, точный и недорогой инструмент идентификации в обычных лабораториях. Первым шагом было создание полной базы данных для видов микобактерий, выделенных при патологиях человека. Затем эту базу данных валидировали с использованием клинических штаммов, культивируемых на плотной и жидкой средах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий. Для создания базы данных использовали пятьдесят три разных вида микобактерий, идентифицированных молекулярными методами. Тридцать восемь являются эталонными штаммами, а 15 являются изолятами, полученными из разных клинических микробиологических отделов (Таблица 1). Триста одиннадцать других клинических и эталонных штаммов, идентифицированных молекулярными методами, использовали для валидации базы данных (Таблица 2). Различными лабораториями были использованы три молекулярных метода: секвенирование гена *hsp65* (все микобактерии, кроме *M. tuberculosis*), секвенирование гена *groB* или *sod* (комплекс *M. abscessus*) и точный тандемный повтор D (ETR-D) для видов *M. tuberculosis* (7, 14, 23, 37).

Условия роста. Штаммы, использованные для создания и валидации базы данных, выращивали на среде Левенштейна-Йенсена (LJ) (Bio-Rad, Hercules, CA). Среди клинических штаммов, использованных для проверки базы данных, 82 также культивировали в пробирке с индикатором роста микобактерий (MGIT) (Becton-Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD) с обогащающей добавкой (олеиновая кислота-альбумин-декстроза-лимонная кислота [OADC]) и антимикробной добавкой (полимиксин В, налидиксовая кислота, триметоприм и азлоциллин [PANTA]). Среду LJ инкубировали при 37°C, за исключением *M. marinum*, *M. brumae*, *M. septicum*, *M. alvei*, *M. goodii* и *M. ulcerans* (30°C), а пробирки MGIT инкубировали при 37°C. Для работы с жизнеспособными микобактериями требуется поддержание третьего уровня биобезопасности. Однако масс-спектрометр, используемый для идентификации бактерий, расположен за пределами безопасной комнаты. Поэтому мы сначала разработали метод для того, чтобы инактивировать микобактерии перед их помещением на мишень, который позволил нам работать с инактивированными микобактериями вне комнаты с третьим уровнем безопасности. Несколько колоний, выращенных на плотной среде, собирали в 40 мкл 70% раствора этанола, чтобы получить обогащенную суспензию. Если пробирка MGIT определялась как положительная, микобактерии осаждали (4500 g, 10 мин), супернатант отбрасывали и осадок ресуспендировали в 30 мкл 70% раствора этанола. Чтобы проверить эффективность инактивации, мы

использовали различные штаммы *M. tuberculosis*, которые суспендировали либо в этаноле, либо в стерильной воде. Эти суспензии держали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем этанол удаляли после стадии центрифугирования и осадок инокулировали в среду LJ и инкубировали при 37 ° С в течение 4 месяцев. Для всех пробирок, инокулированных водными суспензиями, культуры были положительными через 3 недели, тогда как для всех пробирок, инокулированных суспензиями этанола, они были отрицательными после 4-месячной инкубации.

Таблица 1. Штаммы, использованные для создания базы данных МАЛДИ-ТОФ МС для микобактерий

Виды (n = 53)	Комплекс	Источник ^а
<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> complex	ATCC 19977
<i>Mycobacterium alvei</i>		CIP 103464
<i>Mycobacterium africanum</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex	NEM Hospital
<i>Mycobacterium arupense</i>		NRC
<i>Mycobacterium asiaticum</i>		ATCC 25276
<i>Mycobacterium aurum</i>		ATCC 25793
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>M. avium</i> complex (MAC)	CIP 109829
<i>Mycobacterium bohemicum</i>		CIP 105811
<i>Mycobacterium bolletii</i>	<i>M. abscessus</i> complex	CIP 108541
<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex	NRC
<i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guérin (BCG)	<i>M. tuberculosis</i> complex	NEM Hospital
<i>Mycobacterium brumae</i>		CIP 103465
<i>Mycobacterium celatum</i>		CIP 106109
<i>Mycobacterium chelonae</i>		NEM Hospital
<i>Mycobacterium chitae</i>		ATCC 25805
<i>Mycobacterium confluentis</i>		CIP 105510
<i>Mycobacterium diernhoferi</i>		ATCC 19344
<i>Mycobacterium flavescens</i>		ATCC 14474
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> complex	NEM Hospital
<i>Mycobacterium gastri</i>		NEM Hospital
<i>Mycobacterium genavense</i>		AP Hospital
<i>Mycobacterium goodii</i>		CIP 106349
<i>Mycobacterium gordonae</i>		NEM Hospital
<i>Mycobacterium hassiacum</i>		CIP 105218
<i>Mycobacterium immunogenum</i>	<i>M. abscessus</i> complex	CIP 106684
<i>Mycobacterium intermedium</i>		CIP 104542
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>M. avium</i> complex (MAC)	CIP 104243
<i>Mycobacterium kansasii</i>		ATCC 25053
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>		CIP 105465
<i>Mycobacterium mageritense</i>		CIP 104973
<i>Mycobacterium marinum</i>		CIP 104528
<i>Mycobacterium massiliense</i>	<i>M. abscessus</i> complex	CIP 108297
<i>Mycobacterium microti</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex	NRC
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>		NEM Hospital
<i>Mycobacterium neoaurum</i>		ATCC 25795
<i>Mycobacterium palustre</i>		CIP 107748
<i>Mycobacterium parafortuitum</i>		ATCC 19686
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i> complex	NEM Hospital
<i>Mycobacterium phlei</i>		CIP 105389
<i>Mycobacterium porcinum</i>		CIP 105392
<i>Mycobacterium rhodesiae</i>		CIP 106806
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>		CIP 105416
<i>Mycobacterium septicum</i>		CIP 106642
<i>Mycobacterium simiae</i>		ATCC 25273
<i>Mycobacterium smegmatis</i>		MC2 155
<i>Mycobacterium szulgai</i>		CIP 104532
<i>Mycobacterium terrae</i>		CIP 104321
<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>		ATCC 19529
<i>Mycobacterium triplex</i>		CIP 106108
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex	NEM Hospital
<i>Mycobacterium ulcerans</i>		GEIHP
<i>Mycobacterium vaccae</i>		ATCC 23014
<i>Mycobacterium xenopi</i>		NEM Hospital

^a AP, Отдел микробиологии больницы Амбруаза Паре, Булонь-Бийанкур, Франция; ATCC, Американская коллекция типовых культур (Manassas, VA); CIP, Институт коллекций Пастера (Париж, Франция); GEIHP, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Университет Анже, Анжер, Франция; NRC, Национальный эталонный центр по наблюдению за микобактериальными заболеваниями и лекарственной резистентностью, больница Pitié-Salpêtrière, Париж, Франция; NEM, Отдел микробиологии больницы Malec Necker-Enfants Malades, Париж, Франция.

Приборы и анализ данных. Для каждого тестируемого штамма, суспензию в 70% растворе этанола наносили на мишень (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) в пяти повторах и давали высохнуть при комнатной температуре. На каждую лунку наносили 1 мкл раствора матрицы SA (синапиновая кислота, 20 мг / мл, ацетонитрил, 30%, трифторуксусная кислота, 10%) и оставляли кристаллизоваться с образцом при комнатной температуре. Затем в каждую лунку добавляли один микролитр 10 мМ фосфата аммония. Образцы обрабатывали на спектрометре МАЛДИ-ТОФ МС (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) с программным обеспечением «flexControl» (Bruker Daltonics). Положительные ионы извлекали при ускоряющем напряжении 20 кВ в линейном режиме. Каждый спектр составлял сумму «выстрелов» лазера, выполненных в 6 разных областях одной и той же ячейки. Спектры анализировали в диапазоне m/z от 3640 до 19 055. Анализ проводили с помощью программного обеспечения «flexAnalysis», и калибровку осуществляли с помощью белкового калибровочного стандарта I (Bruker Daltonics). Численные данные, полученные на спектрометре (положения пиков и относительная интенсивность для каждого пика), анализировали с использованием программного обеспечения Andromas и сравнивали с базой данных Andromas, которая была разработана с применением ранее описанной стратегии (3, 5). Вкратце, для каждого вида, используемого для разработки базы данных (таблица 1), пять изолятов каждого из выбранных штаммов, перечисленных в таблице 1, выращенных на среде LJ, анализировали с помощью МАЛДИ-ТОФ МС. Мы оставили пики с относительной интенсивностью выше 0,07, которые присутствовали во всех повторностях.

Чтобы валидировать эту базу данных, МАЛДИ-ТОФ МС исследование проводили на бактериях, выращенных на среде LJ (таблица 3) на разных стадиях роста. Быстрорастущие бактерии анализировали каждый день между 1 и 14 днями после выявления положительности культуры. Медленно растущие бактерии анализировали в первый день и через 2 месяца после выявления положительности культуры. Для микобактерий, выращенных в MGIT, МАЛДИ-ТОФ МС проводили после обнаружения положительности. Профили тестируемых изолятов сравнивали с профилями, включенными в базу данных, с использованием программного обеспечения Andromas с учетом возможной ошибки в ± 10 единиц m/z . Для всех протестированных штаммов мы определяли процент общих пиков, полученных с каждым из эталонных штаммов. Идентификация тестируемого штамма соответствовала виду эталонного штамма с наилучшим соответствием в базе данных. Чтобы первое лучшее совпадение было принято, оно должно было иметь показатель $\geq 60\%$. Мы рассматривали разницу в $\geq 10\%$ между показателями первого и второго совпадения как минимум, необходимый, чтобы считать идентификацию правильной.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Создание базы данных микобактерий. 53 отобранных штамма, выращенных на среде LJ, анализировали с помощью МАЛДИ-ТОФ МС, как описано в Материалах и методах. Стандартное отклонение для каждого сохраненного пика не превышало 10 единиц m/z . Для каждого выбранного штамма мы обнаружили видоспецифичный спектральный профиль, позволяющий идентифицировать на уровне видов 44 вида и на уровне микобактериальной клады 9 штаммов, принадлежащих комплексу *M. abscessus* и комплексу *M. tuberculosis*.

Чтобы оценить, может ли продолжительность периода роста влиять на спектральный профиль, МАЛДИ-ТОФ МС проводили с культурами разного возраста. На рисунке 1 представлены спектры 4-х разных видов: 2-х быстрорастущих (*M. abscessus* и *M. fortuitum*) через 1 и 14 дней после определения культуры как положительной и 2-х медленно растущих (*M. tuberculosis* и *M. avium*) через 1 день и через 2 месяца после определения культуры как положительной. Несмотря на то, что возраст культуры влияет на спектры МАЛДИ-ТОФ МС, эта задержка не влияла на видоспецифичные профили.

Валидация базы данных микобактерий. (i) Количество повторов. Определено количество повторов измерений для данного штамма, необходимое для получения хорошего спектра и, следовательно, правильной идентификации. Вероятность получения правильной регистрации спектра увеличивается с количеством повторов, сделанных на одной и той же суспензии. Результаты показаны в таблице 4. Пять повторов

позволяют проводить правильную идентификацию для 99% и 79% протестированных штаммов, для быстро и медленно растущих микобактерий, соответственно.

(ii) Идентификация тестируемых штаммов. Среди 311 протестированных штаммов, выращенных на плотной среде, МАЛДИ-ТОФ МС позволил получить достоверную идентификацию в 97% случаев. Для 3% тестируемых штаммов идентификация не получена из-за низкого качества спектров. Не было отмечено случаев ошибочной идентификации. Некоторые виды различимы только на уровне комплекса из-за высокого сходства между их спектрами. Например, *M. abscessus*, *M. massiliense* и *M. bolletii* имеют высокую степень генетического сходства, что приводит к одному уникальному спектру масс, характерному для этих трех подвидов. То же самое наблюдалось для *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti* и *M. africanum*. В целом, правильные данные идентификации были получены для 210 штаммов на уровне видов и 93 штаммов на уровне комплекса (таблица 2). Когда бактерии выращивали на жидких средах, наблюдали хорошую идентификацию для 63 штаммов из 82 (77%), тогда как 19 штаммов из 82 не могли быть идентифицированы (таблица 3).

Таблица 2. Идентификация микобактерий, выращенных на плотной среде, с помощью МАЛДИ-ТОФ МС

Виды	Число протестированных штаммов	Число правильных идентификаций МАЛДИ-ТОФ МС		Отсутствие идентификации ^f
		Виды	Комплексе	
<i>M. tuberculosis</i>	18 ^b		17	1
<i>M. bovis</i> BCG	14 ^b		14	
<i>M. africanum</i>	3 ^{b,c}		3	
<i>M. avium</i>	25 ^{b,c}	24		1
<i>M. intracellulare</i>	19 ^{a,b,c}	17	2	
<i>M. xenopi</i>	26 ^{a,b,c}	26		
<i>M. kansasii</i>	14 ^c	14		
<i>M. abscessus</i>	47 ^{b,c,d}		46	1
<i>M. massiliense</i>	6 ^{b,d}		6	
<i>M. bolletii</i>	3 ^d		3	
<i>M. chelonae</i>	26 ^c	25		1
<i>M. fortuitum</i>	26 ^{a,b,c}	25		1
<i>M. peregrinum</i>	16 ^{a,b,c}	13	2	1
<i>M. mucogenicum</i>	20 ^{b,c}	19		1
<i>M. gordonae</i>	27 ^{b,c}	26		1
<i>M. diemhoferi</i>	1 ^b	1		
<i>M. gastri</i>	2 ^b	2		
<i>M. thermoresistibile</i>	1 ^f	1		
<i>M. confluentis</i>	1 ^a	1		
<i>M. neoaurum</i>	1 ^f	1		
<i>M. chitae</i>	1 ^f	1		
<i>M. smegmatis</i>	1 ^f	1		
<i>M. vaccae</i>	1 ^f	1		
<i>M. aurum</i>	1 ^f	1		
<i>M. porcinum</i>	1 ^b	1		
<i>M. scrofulaceum</i>	1 ^f	1		
<i>M. brumae</i>	1 ^a	1		
<i>M. septicum</i>	1 ^a	1		
<i>M. marinum</i>	2 ^f	2		
<i>M. parafortuitum</i>	1 ^f	1		
<i>M. ulcerans</i>	4 ^g	4		

^a Отделение микробиологии больницы Амбруаз Пари, Булонь-Бийанкур, Франция.

^b Отделение микробиологии больницы Malek Necker-Enfants Malades, Париж, Франция.

^c Национальный эталонный центр по наблюдению за микобактериальными заболеваниями и лекарственной резистентностью, больница Пити-Сальпетри, Париж, Франция.

^d Отделение микробиологии больницы Раймонда Пуанкаре, Гарчес, Франция.

^e Количество штаммов, для которых не было получено никаких спектров и которые, следовательно, не были идентифицированы.

^f Эталонные штаммы.

^g Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Университет Анже, Анже, Франция.

Таблица 3. Идентификация микобактерий, выращенных на жидкой среде, с помощью МАЛДИ-ТОФ МС

Виды	Число протестированных штаммов	Число правильных идентификаций МАЛДИ-ТОФ МС		Отсутствие идентификации ^а
		Виды	Комплексы	
<i>M. tuberculosis</i>	7		7	
<i>M. bovis BCG</i>	2		2	
<i>M. africanum</i>	1		1	
<i>M. avium</i>	5	4		1
<i>M. intracellulare</i>	7	2		5
<i>M. xenopi</i>	5	2		3
<i>M. kansasii</i>	7	3		4
<i>M. abscessus</i>	6		5	1
<i>M. massiliense</i>	2		2	
<i>M. bolletii</i>	1		1	
<i>M. chelonae</i>	8	6		2
<i>M. fortuitum</i>	8	6		2
<i>M. mucogenicum</i>	8	8		
<i>M. peregrinum</i>	7	6		1
<i>M. goodii</i>	8	8		

^а Количество штаммов, для которых не было получено никакой идентификации.

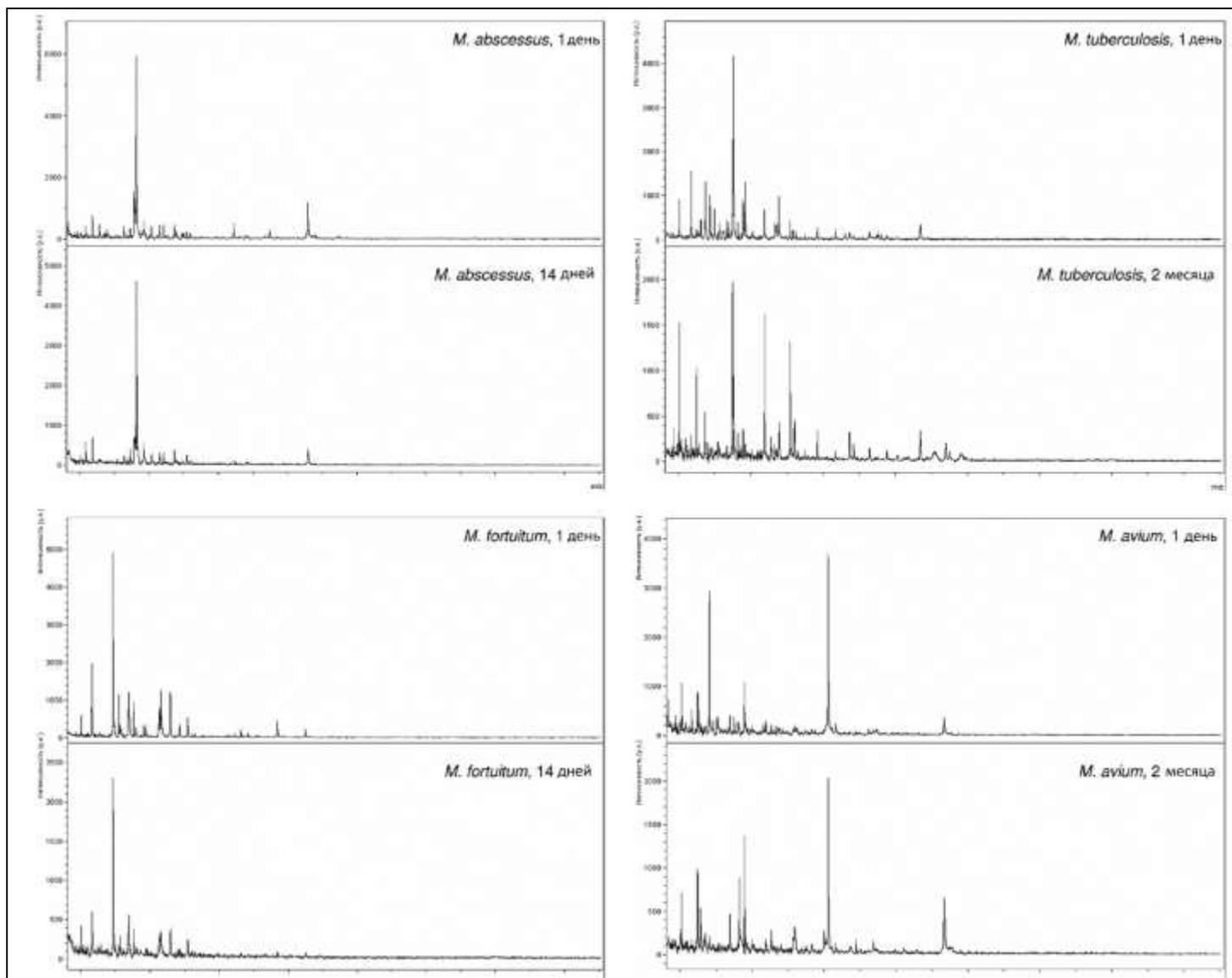


Рисунок 1. Спектры, полученные для различных видов микобактерий при различных временах культивирования после выявления позитивности культуры.

Таблица 4. Вероятности получения правильного определения в зависимости от числа повторностей

Тип (число видов)	Вероятность (%) получения хорошей регистрации с:			
	2 повторности	3 повторности	4 повторности	5 повторностей
Все взятые виды (337)	67	74	80	87
Быстро растущие микобактерии (159)	79	86	92	99
Медленно растущие микобактерии (178)	57	65	72	79

ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано, что МАЛДИ-ТОФ МС значительно улучшает обычную идентификацию бактерий (3, 5, 8). В настоящей работе мы продемонстрировали, что наша ранее описанная стратегия идентификации бактерий с помощью МАЛДИ-ТОФ МС может быть распространена на виды микобактерий. Наша стратегия, основанная на использовании цельных клеток, позволяет избежать трудоемких этапов экстрагирования. Правильная идентификация получена для 97% (плотная среда) и 77% (жидкая среда) всех тестируемых штаммов. Для 3% микобактерий, протестированных в среде LJ, идентификация не была получена из-за плохого качества спектров, вероятно, из-за недостаточного количества материала культуры и/или из-за частоты мукоидного характера штаммов, подлежащих идентификации. Результаты в жидкой среде не так хороши, как результаты, полученные для плотной среды. Это происходит главным образом из-за сбоев в регистрации спектров, обусловленных либо малым количеством бактерий, либо возможной интерференцией добавок, включенных в сложную среду (PANTA и OADC). Следует отметить, что в этом исследовании была проверена только жидкая среда MGIT. Было бы интересно проверить эффективность этого метода на других коммерчески доступных жидких средах. Более длительная инкубация в среде MGIT после первого отрицательного анализа может повысить чувствительность этого метода, как это имеет место для AccuProbe и иммунохроматографического набора, которые могут дать положительные результаты после продолжительной инкубации (13).

Следует отметить, что, независимо от используемой среды, ни один из штаммов не был идентифицирован в этом исследовании неправильно, в отличие от результатов, полученных с использованием методов быстрой идентификации, таких как гибридизация или ДНК-стрипы (33).

Мы также показали, что большое количество повторностей увеличивает вероятность хорошей идентификации, особенно для медленно растущих микобактерий: в некоторых случаях для получения одной хорошей регистрации спектра требовалось пять повторов. Это поразительное отличие от идентификации обычно выделяемых бактерий с помощью МАЛДИ-ТОФ МС, которая обычно требует только одной повторности (3, 5).

Идентификация штаммов комплекса *M. tuberculosis* основывается главным образом на использовании гибридизации ДНК (AccuProbe). Недавно был внедрён иммунохроматографический тест (11). Оба эти метода эффективны, обладают отличной чувствительностью и специфичностью (13, 16). Также доступны технологии ДНК-стрипов, такие как Inno-LiPa Mycobacteria или GenoType Mycobacterium. Эти методы не позволяют идентифицировать бактерии до уровня вида в рамках этого комплекса. Технология МАЛДИ-ТОФ МС также может идентифицировать штаммы, относящиеся к комплексу *M. tuberculosis*, но также не до видового уровня. Идентификация бактериальных видов, относящихся к этому комплексу, может быть выполнена с использованием набора специфических ДНК-стрипов (GenoType MTBC) (22).

Среди медленно растущих микобактерий, комплекс *M. avium* (MAC), *M. xenopi* и *M. kansasii* часто участвуют в клинической патологии, поэтому их необходимо правильно идентифицировать. Точная идентификация комплекса *M. avium* сложна. Среди трех зондов, используемых в методе AccuProbe (MAC, *M. avium* и *M. intracellulare*), отмечается отсутствие специфичности зондов MAC и *M. intracellulare*. Кроме того, сообщалось об ошибочной идентификации и отсутствии идентификации с использованием технологии ДНК-стрипов (9, 19, 25, 33). Метод МАЛДИ-ТОФ МС может различать два вида MAC за один шаг, в отличие от метода AccuProbe, для которого требуется два зонда для точной идентификации этих бактериальных видов.

Идентификация *M. xenopi* с плотной среды дала 100% хороших результатов в случае МАЛДИ-ТОФ МС, что эквивалентно результатам, полученным с использованием технологий ДНК-стрипов. *M. kansasii* классически идентифицируется гибридными методами (33). *M. kansasii*, выращенный на среде LJ, надежно идентифицируется с использованием метода МАЛДИ-ТОФ МС. С другой стороны, сообщалось об ошибочной идентификации этого микроорганизма как *M. gastri* при использовании ДНК-стрипов (19, 33).

В настоящее время идентификацию быстрорастущих микобактерий проводят с использованием методов ДНК-стрипов или амплификации с последующим секвенированием. Среди быстрорастущих микобактерий важно быстро различать *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* и часто встречающийся загрязняющий микроорганизм *M. gordonae*. Набор Inno-LiPa Mycobacteria v2 не способен отличить *M. chelonae* от *M. abscessus* (33), а GenoType Mycobacterium CM не способен отличить *M. chelonae* от *M. immunogenum* и *M. abscessus* от *M. immunogenum* (22). Однако, основываясь на спектральных профилях МАЛДИ-ТОФ МС и, принимая во внимание особенности культуры, *M. abscessus*, *M. immunogenum* и *M. chelonae* можно различить. *M. abscessus* может расти в среде с 5% NaCl, в отличие от *M. Immunogenum* и *M. chelonae* (15). МАЛДИ-ТОФ МС может различать *M. immunogenum* и *M. chelonae*. Однако *M. abscessus* не отличается от *M. bolletii* или *M. massiliense*. *M. abscessus*, *M. massiliense* и *M. bolletii* имеют идентичные спектры, что согласуется с результатами, недавно опубликованными Leao и др. (15). Эти авторы предложили пересмотреть таксономический статус комплекса *M. abscessus*, так, чтобы *M. abscessus*, *M. massiliense* и *M. bolletii* принадлежали одному виду (*M. abscessus*).

M. fortuitum может быть ошибочно идентифицирована с помощью ДНК-стрипов, что приводит к множеству ошибочных идентификаций (24, 32, 33). С другой стороны, МАЛДИ-ТОФ МС правильно идентифицирует вид *M. fortuitum*, и только 2 из 16 штаммов *M. peregrinum* были идентифицированы только на уровне комплекса *M. fortuitum*. *M. gordonae* может быть прекрасно идентифицирован AccuProbe (16). С тест-полоской ДНК Inno-LiPa Mycobacteria v2 были отмечены случаи неправильной идентификации (33) или отсутствия идентификации (23). С помощью МАЛДИ-ТОФ МС, были получены 34 хороших идентификации из 35 независимо от используемой среды.

Бактерии, которые редко изолируют в клинических лабораториях, также могут быть идентифицированы по нашей базе данных: если штаммы микобактерий не распознаются, поскольку их спектры не совпадают с любым эталонным штаммом, присутствующим в базе данных, их идентифицируют с помощью молекулярных методов. Эти новые спектры затем легко добавить в нашу базу данных.

В некоторых случаях быстрорастущие микобактерии растут на обычных средах (например, кровяном агаре). В этих случаях MALDI TOF MS можно провести сразу же после кислотно-быстрого окрашивания с использованием того же оборудования, что и для обычных бактерий или грибов, что позволяет избежать ошибочных идентификаций (27, 35).

Другие исследования продемонстрировали потенциал MALDI TOF MS для идентификации микобактерий (12, 18, 21). Эти работы подчеркивали воспроизводимость и специфичность этого метода. Pignone и др. описана стратегия, основанная на значениях среднеквадратичного отклонения (RMS) для сравнения различных профилей (21). Hettick и др. разработали биостатистический анализ для видовой идентификации микобактерий. Этот метод не позволял отличить близкородственные виды, такие, как принадлежащие к MAC (12). Lefmann и др. использовали МАЛДИ-ТОФ МС в качестве метода для идентификации микобактерий на основе гена 16S рРНК, для чего сначала требуются стадии ПЦР и транскрипции-расщепления транскриптов РНКазой (18). Однако этот метод занимает много времени.

В данном исследовании мы не работали над спектральными различиями на уровне штаммов. Последующие исследования спектральных профилей необходимы для определения конкретных маркеров, которые бы позволили нам отличать чувствительные к лекарственным средствам и резистентные микобактерии. В настоящее время некоторые штаммы, относящиеся к одному и тому же комплексу видов, не различаются МАЛДИ-ТОФ МС.

Стратегия, описанная в этой работе, использующая целые бактериальные клетки, является простой и быстрой. Её можно легко внедрить в обычные клинические лаборатории. Этот метод может быть выполнен в течение нескольких минут любым оператором, тогда как для секвенирования требуется в среднем 3 дня и квалифицированные специалисты, а для анализа с помощью ДНК-стрипов необходимы 6 часов. Экономия средств при использовании метода МАЛДИ-ТОФ МС значительна (1 евро / образец) по сравнению с другими

молекулярными методами (в 40 раз более дорогими). Наконец, следует отметить, что системы на основе МАЛДИ-ТОФ МС производят меньше отходов, чем методы, основанные на молекулярной биологии, использующие много одноразовых материалов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим Жилия Кюнеса за его техническую помощь и Лорана Марсолье за любезное предоставление нам штаммов *M.ulcerans*.

Эта работа была поддержана грантами PHRC (Программа Hospitalier de Recherche Clinique, № BOS07001 и AOM08181) и была софинансирована DGA (Direction Ge'ne'rale de l'Armement).

Брунгильда Дофин работает в Andromas. Ксавьер Нассиф является акционером Andromas.

ССЫЛКИ

1. **Ashford, D. A., E. Whitney, P. Raghunathan, and O. Cosivi.** 2001. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev. Sci. Tech.* **20**:325–337.
2. **Butler, W. R., and L. S. Guthertz.** 2001. Mycolic acid analysis by highperformance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:704–726.
3. **Carbonnelle, E., J. L. Beretti, S. Cottyn, G. Quesne, P. Berche, X. Nassif, and A. Ferroni.** 2007. Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2156–2161.
4. **Claydon, M. A., S. N. Davey, V. Edwards-Jones, and D. B. Gordon.** 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **14**:1584–1586.
5. **Degand, N., E. Carbonnelle, B. Dauphin, J. L. Beretti, M. Le Bourgeois, I. Sermet-Gaudelus, C. Segonds, P. Berche, X. Nassif, and A. Ferroni.** 2008. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **46**:3361–3367.
6. **Devulder, G., M. Perouse de Montclos, and J. P. Flandrois.** 2005. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:293–302.
7. **Djelouadji, Z., D. Raoult, M. Daffe, and M. Drancourt.** 2008. A single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**:e253.
8. **Dupont, C., V. Sivadon-Tardy, E. Bille, B. Dauphin, J. L. Beretti, A. S. Alvarez, N. Degand, A. Ferroni, M. Rottman, J. L. Herrmann, X. Nassif, E. Ronco, and E. Carbonnelle.** 2010. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**:998–1004.
9. **Gitti, Z., I. Neonakis, G. Fanti, F. Kontos, S. Maraki, and Y. Tselentis.** 2006. Use of the GenoType *Mycobacterium* CM and AS assays to analyze 76 nontuberculous mycobacterial isolates from Greece. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 2244–2246.
10. **Hance, A. J., B. Grandchamp, V. Levy-Frebault, D. Lecossier, J. Rauzier, D. Bocart, and B. Gicquel.** 1989. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.* **3**:843–849.
11. **Hettick, J. M., M. L. Kashon, J. P. Simpson, P. D. Siegel, G. H. Mazurek, and D. N. Weissman.** 2004. Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **76**:5769–5776.
12. **Hettick, J. M., M. L. Kashon, J. E. Slaven, Y. Ma, J. P. Simpson, P. D. Siegel, G. N. Mazurek, and D. N. Weissman.** 2006. Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. *Proteomics* **6**:6416–6425.
13. **Ismail, N. A., K. Baba, D. Pombo, and A. A. Hoosen.** 2009. Use of an immunochromatographic kit for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* from broth cultures. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **13**:1045–1047.
14. **Kim, B. J., S. H. Lee, M. A. Lyu, S. J. Kim, G. H. Bai, G. T. Chae, E. C. Kim, C. Y. Cha, and Y. H. Kook.** 1999. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J. Clin. Microbiol.* **37**:1714–1720.
15. **Leao, S. C., E. Tortoli, C. Viana-Niero, S. Y. Ueki, K. V. Lima, M. L. Lopes, J. Yubero, M. C. Menendez, and M. J. Garcia.** 2009. Characterization of mycobacteria from a major Brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae*-*M. abscessus* group is needed. *J. Clin. Microbiol.* **47**:2691–2698.
16. **Lebrun, L., F. Espinasse, J. D. Poveda, and V. Vincent-Levy-Frebault.** 1992. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2476–2478.
17. **Lee, H., H. J. Park, S. N. Cho, G. H. Bai, and S. J. Kim.** 2000. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2966–2971.

18. **Lefmann, M., C. Honisch, S. Bocker, N. Storm, F. von Wintzingerode, C. Schlotelburg, A. Moter, D. van den Boom, and U. B. Gobel.** 2004. Novel mass spectrometry-based tool for genotypic identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **42**:339–346.
19. **Ma'kinen, J., M. Marjamaki, H. Marttila, and H. Soini.** 2006. Evaluation of a novel strip test, GenoType Mycobacterium CM/AS, for species identification of mycobacterial cultures. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:481–483.
20. **Maugein, J.** 2007. Identification moleculaire des mycobacteries non tuberculeuses. *Rev. Francophone Lab.* **37**:57–62.
21. **Pignone, M., K. M. Greth, J. Cooper, D. Emerson, and J. Tang.** 2006. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1963–1970.
22. **Richter, E., M. Weizenegger, A. M. Fahr, and S. Rusch-Gerdes.** 2004. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in cultures obtained from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4303–4306.
23. **Ringuet, H., C. Akoua-Koffi, S. Honore, A. Varnerot, V. Vincent, P. Berche, J. L. Gaillard, and C. Pierre-Audigier.** 1999. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **37**:852–857.
24. **Russo, C., E. Tortoli, and D. Menichella.** 2006. Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* **44**:334–339.
25. **Sarkola, A., J. Mäkinen, M. Marjamaki, H. J. Marttila, M. K. Viljanen, and H. Soini.** 2004. Prospective evaluation of the GenoType assay for routine identification of mycobacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**:642–645.
26. **Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. E. Fournier, J. M. Rolain, and D. Raoult.** 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* **49**:543–551.
27. **Short, W. R., C. Emery, M. Bhandary, and J. A. O'Donnell.** 2005. Misidentification of *Mycobacterium peregrinum*, the causal organism of a case of bacteremia and automatic implantable cardioverter defibrillator-associated infection, due to its unusual acid-fast staining characteristics. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2015–2017.
28. **Song, S. H., K. U. Park, J. H. Lee, E. C. Kim, J. Q. Kim, and J. Song.** 2009. Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the mycolic acid profiles for the identification of common clinical isolates of mycobacterial species. *J. Microbiol. Methods* **77**:165–177.
29. **Springer, B., L. Stockman, K. Teschner, G. D. Roberts, and E. C. Bottger.** 1996. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* **34**:296–303.
30. **Suffys, P. N., A. da Silva Rocha, M. de Oliveira, C. E. Campos, A. M. Barreto, F. Portaels, L. Rigouts, G. Wouters, G. Jannes, G. van Reybroeck, W. Mijs, and B. Vanderborght.** 2001. Rapid identification of *Mycobacteria* to the species level using INNO-LiPA *Mycobacteria*, a reverse hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4477–4482.
31. **Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Bottger, and T. Bodmer.** 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* **31**:175–178.
32. **Tortoli, E., A. Mariottini, and G. Mazzarelli.** 2003. Evaluation of INNOLiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4418–4420.
33. **Tortoli, E., M. Pecorari, G. Fabio, M. Messino, and A. Fabio.** 2010. Commercial DNA probes for mycobacteria incorrectly identify a number of less frequently encountered species. *J. Clin. Microbiol.* **48**:307–310.
34. **van Veen, S. Q., E. C. Claas, and E. J. Kuijper.** 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **48**:900–907.
35. **Williamson, J. C., T. A. Miano, M. R. Morgan, and E. L. Palavecino.** 2010. Fatal *Mycobacterium abscessus* endocarditis misidentified as *Corynebacterium* spp. *Scand. J. Infect. Dis.* **42**:222–224.
36. **Woo, P. C., S. K. Lau, J. L. Teng, H. Tse, and K. Y. Yuen.** 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**:908–934.
37. **Zolg, J. W., and S. Philippi-Schulz.** 1994. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2801–2812.