

Перевод. Оригинальная статья: Naoto Matsuda, Mari Matsuda, Shigeyuki Notake, Hirohide Yokokawa, Yoshiaki Kawamura, Keiichi Hiramatsu, and Ken Kikuchi. **Evaluation of a Simple Protein Extraction Method for Species Identification of Clinically Relevant Staphylococci by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry**, *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50 (12):3862-3866

Оценка простого метода экстракции белков для идентификации видов клинически значимых стафилококков с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации – времяпролетной масс-спектрометрии

Naoto Matsuda,^{a,c} Mari Matsuda,^a Shigeyuki Notake,^{a,b} Hirohide Yokokawa,^c Yoshiaki Kawamura,^d Keiichi Hiramatsu,^a и Ken Kikuchi^a

Кафедра контроля инфекций, медицинский факультет, Университет Джунтендо, Токио, Япония^a; Miroku Medical Laboratory Inc., Саку, Япония^b; Кафедра общей медицины, медицинский факультет, Университет Джунтендо, Токио, Япония^c; и Кафедра микробиологии, Университет Айчигакуин, Фармацевтическая школа, Нагоя, Япония^d

В клинической микробиологии идентификация бактерий является трудоемкой и требует много времени. Решением этой проблемы является использование матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации – времяпролетной масс-спектрометрии (МАЛДИ-ТОФ МС). В этом исследовании мы оценили модифицированный метод экстракции белков, выполняемый на мишенях (метод экстракции на мишени), с помощью масс-спектрометра МАЛДИ-ТОФ (Bruker Microflex LT с версией 3.0 Biotyper) и сравнили его с двумя ранее описанными методами: методом прямого нанесения и стандартным методом белковой экстракции (метод стандартной экстракции). Для исследования мы использовали образцы 273 клинических изолятов и 14 эталонных штаммов стафилококков. Все изоляты характеризовали по сиквенсу гена супероксиддисмутазы А. До вида идентифицированы методом экстракции на мишени 257 изолятов (89,5%), стандартной экстракцией 232 изолята (80,8%), прямым нанесением – 173 изолята (60,2%) со статистическими различиями между тремя методами ($P < 0,05$). Мы пришли к заключению, что метод экстракции на мишени по меньшей мере столь же хорош для идентификации, как стандартная экстракция, и имеет преимущество – более короткое время обработки образцов.

Введение

Матрично-активированную лазерную десорбцию/ионизацию – времяпролетную масс-спектрометрию (МАЛДИ-ТОФ МС) использовали в клинических лабораториях для идентификации различных микроорганизмов, включая грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии, дрожжи и даже мицелиальные грибы (1, 8, 10, 12, 14, 16-19, 21, 22, 24). Это быстрая и недорогая альтернатива молекулярной идентификации, обеспечивающая эквивалентную точность (6). Кроме того, полная бактериальная идентификация с помощью МАЛДИ-ТОФ МС более экономична по сравнению с традиционными методами (9, 15, 22). Были описаны два метода идентификации на основе МАЛДИ-ТОФ МС (1, 4, 5): метод прямого нанесения и стандартный метод белковой экстракции (метод стандартной экстракции). Метод прямого нанесения осуществляется путем взятия колоний с культуральной чашки и нанесения их в виде тонкого слоя на мишень с последующим нанесением матрицы для масс-спектрометрического анализа МАЛДИ-ТОФ МС (1). Этот метод прост и может быть выполнен быстро, но по точности он уступает методу стандартной экстракции. Данный недостаток особенно заметен для грамположительных организмов из-за недостаточного разрушения клеточной стенки (1). Метод стандартной экстракции в отличие от прямого нанесения использует муравьиную кислоту и ацетонитрил для разрушения клеток до того, как образец будет нанесён на мишень и проанализирован МАЛДИ-ТОФ МС. Метод стандартной экстракции включает в себя 2 этапа центрифугирования и требует приблизительно в 6 раз больше рабочего времени, чем метод прямого нанесения.

Мы опробовали метод экстракции на мишени, который может быть выполнен на мишени без каких-либо этапов центрифугирования. В нашем исследовании метод экстракции на мишени сравнивался как с

методом прямого нанесения, так и с методом стандартной экстракции при идентификации клинических изолятов стафилококка с помощью МАЛДИ-ТОФ МС.

Материалы и методы

Изоляты бактерий. В этом исследовании использовали 273 неповторяющихся клинических изолята стафилококка и 14 эталонных штаммов (*Staphylococcus aureus* NCTC 8325, *S. epidermidis* ATCC 14490^T, *Staphylococcus capitis* подвид *capitis* CCUG 7326^T, *Staphylococcus capitis* подвид *ureolyticus* ATCC 49326, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970^T, *Staphylococcus lugdunensis* ATCC 43809^T, *Staphylococcus saprophyticus* JCM 2427^T, *Staphylococcus cohnii* ATCC 29974^T, *Staphylococcus hominis* ATCC 27844^T, *Staphylococcus pettenkoferi* CCUG 51279^T, *Staphylococcus schleiferi* подвид *schleiferi* ATCC 43808^T, *Staphylococcus schleiferi* подвид *coagulans* JCM 7470, *Staphylococcus warneri* ATCC 27836^T, and *Staphylococcus caprae* ATCC 33538^T). Все штаммы перед использованием хранили при -80°C, предварительно культивировали 12 – 24 часа и культивировали в аэробных условиях в течение ночи на агаре, обогащенном 5% овечьей кровью, при 37°C.

Идентификация видов стафилококков. Выделенные виды идентифицировали с помощью частичного секвенирования гена супероксиддисмутазы A (*sodA*) с праймерами d1 и d2, как было описано ранее (20, 23). Все изоляты рассматривались как правильно идентифицированные, если ген *sodA* показывал ≥98% совпадения последовательности с ближайшей последовательностью гена вида в базе данных GenBank. Профили последовательности *sodA* и источники клинических изолятов представлены в приложенных материалах.

МАЛДИ-ТОФ МС. Для метода прямого нанесения бактерии наносили (с помощью стерильных зубочисток) в виде тонких пленок на ячейки 96-луночных полированных мишеней из нержавеющей стали (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany). Затем их подсушивали при комнатной температуре в течение 1 минуты. После высушивания на образцы наносили по 1,5 мкл раствора матрицы, представляющего собой насыщенный раствор альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (Bruker Daltonik) в 50% ацетонитриле (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) и 2,5% трифторуксусной кислоте (Wako), которая сокристаллизовалась с ними при комнатной температуре в течение 10 мин.

Для метода экстракции на мишени каждый изолят наносили и подсушивали на мишени, как и в методе прямого нанесения. После этого 0,5 мкл 70% муравьиной кислоты (Wako) наслаивали на образец пипетированием, затем добавляли 0,5 мкл ацетонитрила. Высушили при комнатной температуре в течение приблизительно 10 мин. Наконец, на ячейку наносили 1,5 мкл раствора матрицы, как в методе прямого нанесения.

Для метода стандартной экстракции небольшую часть единичной колонии суспендировали в 300 мкл дистиллированной воды, корректировали по стандарту McFarland 2 и добавляли 900 мкл абсолютного этанола. Суспензию интенсивно встряхивали и центрифугировали при 20 000 x g в течение 2 мин. Супернатант отбрасывали и осадок высушивали при 55°C в течение по меньшей мере 30 мин. Затем добавляли 50 мкл 70% муравьиной кислоты и тщательно перемешивали пипетированием. Затем добавляли 50 мкл ацетонитрила и образец снова центрифугировали при 20000 X g в течение 2 мин. Затем 1 мкл надосадочной жидкости помещали на мишень и оставляли сушиться в течение приблизительно 10 мин при комнатной температуре. Наконец, на ячейку наносили 1,5 мкл раствора матрицы, как и в методе прямого нанесения.

Образцы, полученные каждым методом, загружали в масс-спектрометр MicroFlex LT (Bruker Daltonik), и результаты анализировали с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik). Каждое измерение проводили только один раз для каждой культуры. Штамм *Escherichia coli* DH5α использовали для осуществления контроля качества, как рекомендовано производителем, в каждом эксперименте.

Анализ данных. Рекомендованные производителем критерии идентификации по логарифму числового значения достоверности идентификации использовали следующим образом: логарифм числового значения достоверности идентификации от 2,000 до 3,000 означал идентификацию на уровне вида, логарифм числового значения достоверности идентификации от 1,700 до 1,999 означал идентификацию на уровне рода и логарифм числового значения достоверности идентификации <1,700 означал ненадежную идентификацию. Эксперименты проводили в двух повторах. Для уровней идентификации до рода и вида для анализа использовали менее строгий критерий идентификации. Если 1

изолят был идентифицирован на уровне рода в первом эксперименте и идентифицирован на уровне вида во втором эксперименте, для анализа использовали идентификацию на уровне рода. Если 2 эксперимента давали различные результаты, такие как идентификацию на уровне рода и ненадежную идентификацию, результат идентификации рассматривался как ненадежный. Дополнительно, коэффициенты для различных уровней идентификации (уровень рода, уровень вида или ненадежная идентификация) рассчитывали по числу различных уровней в первом и втором экспериментах, деленному на общее число изолятов. Различные результаты идентификации МАЛДИ-ТОФ и молекулярной идентификации (секвенирования) рассматривали как ошибочную идентификацию. Кроме того, когда Biotyper устанавливал только идентификацию на уровне рода (логарифм числового значения достоверности идентификации 1,70 – 2,00), то возможную идентификацию до вида оценивали в соответствии с порядком величин логарифмов числового значения достоверности идентификации. Различные результаты по виду между кандидатом с наибольшим логарифмом числового значения достоверности идентификации и молекулярной идентификацией классифицировали как противоречивые результаты. В таких случаях проводили анализ белкового профиля. Дендрограмму создавали с помощью программного обеспечения Biotyper 3.0. Все процедуры, связанные с МАЛДИ-ТОФ МС – идентификацией выполнялись только подготовленным персоналом.

Статистический анализ. Сравнение идентификации уровней рода и вида между тремя методами пробоподготовки выполняли с помощью хи-квадрат-тестов. Значение $P < 0,05$ рассматривали как статистически значимое.

Результаты

Показатели идентификации для трех различных методов. Показатели идентификации, полученные с использованием трех различных методов, показаны в Таблице 1. Метод экстракции на мишени позволил идентифицировать 283 (98,6%) изолятов на уровне рода и 257 (89,5%) изолятов на уровне вида. В то же время метод стандартной экстракции позволил идентифицировать 283 (98,6%) изолятов на уровне рода и 232 (80,8%) изолятов на уровне вида, а метод прямого нанесения позволил идентифицировать 256 (89,2%) изолятов на уровне рода и 173 (60,2%) на уровне вида.

| Организм | Число изолятов | Число изолятов (% правильных), идентифицированных с помощью а: | | | | | | Количество спектров в базе данных |
|-------------------------------------|----------------|--|--------------|----------------------|--------------|-------------------------|--------------|-----------------------------------|
| | | Стандартная экстракция | | Экстракция на мишени | | Метод прямого нанесения | | |
| | | Уровень рода | Уровень вида | Уровень рода | Уровень вида | Уровень рода | Уровень вида | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 64 | 64 (100) | 63 (98.4) | 64 (100) | 63 (98.4) | 64 (100) | 56 (87.5) | 12 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 93 | 93 (100) | 87 (93.5) | 93 (100) | 89 (95.7) | 93 (100) | 64 (68.8) | 9 |
| <i>Staphylococcus capitis</i> | 20 | 20 (100) | 20 (100) | 20 (100) | 18 (90) | 20 (100) | 16 (80) | 6 |
| <i>Staphylococcus caprae</i> | 24 | 22 (91.6) | 1 (4.2) | 24 (100) | 18 (75) | 21 (87.5) | 6 (25) | 2 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 19 | 19 (100) | 18 (94.7) | 18 (94.7) | 17 (89.4) | 16 (88.9) | 7 (36.8) | 8 |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | 21 | 21 (100) | 21 (100) | 20 (95.2) | 19 (90.4) | 21 (100) | 17 (80.9) | 6 |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 19 | 17 (89.4) | 1 (5.2) | 19 (100) | 15 (78.9) | 5 (26.3) | 0 (0) | 8 |
| <i>Staphylococcus cohnii</i> | 3 | 3 (100) | 0 (0) | 1 (33.3) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 5 |
| <i>Staphylococcus hominis</i> | 7 | 7 (100) | 7 (100) | 7 (100) | 7 (100) | 7 (100) | 5 (71.4) | 6 |
| <i>Staphylococcus pettenkoferi</i> | 5 | 5 (100) | 2 (40) | 5 (100) | 5 (100) | 5 (100) | 1 (20) | 5 |
| <i>Staphylococcus schleiferi</i> | 6 | 6 (100) | 6 (100) | 6 (100) | 4 (66.7) | 2 (33.3) | 1 (16.6) | 6 |
| <i>Staphylococcus warneri</i> | 6 | 6 (100) | 6 (100) | 6 (100) | 2 (33.3) | 2 (33.3) | 0 (0) | 4 |
| Всего | 287 | 283 (98.6) | 232 (80.8)* | 283 (98.6) | 257 (89.5)** | 256 (89.2) | 173 (60.2) | |

а *, $P < 0.05$ против метода прямого нанесения для идентификации на уровне вида; **, $P < 0.05$ против как метода прямого нанесения, так и метода стандартной экстракции для идентификации на уровне вида;

Между методом экстракции на мишени и методом стандартной экстракции не было статистически значимых различий в идентификации на уровне рода ($P = 0,1545$), но с помощью метода экстракции на мишени были достигнуты существенно более высокие показатели идентификации на уровне вида, чем с помощью метода стандартной экстракции ($P < 0,0001$). С другой стороны, метод прямого нанесения дал более низкие показатели идентификации на уровне вида, чем дали как метод стандартной экстракции ($P < 0,0001$), так и метод экстракции на мишени ($P = 0,0450$). Показатели для разных уровней идентификации в первом и втором экспериментах были 30 (10,4%), 23 (8%) и 79 (27,5%) для стандартной экстракции,

экстракции на мишени и метода прямого нанесения, соответственно (данные не показаны). В идентификации до вида были обнаружены большие отличия между экстракцией на мишени и стандартной экстракцией для *S. caprae* (75% и 4.2%, соответственно) и *S. saprophyticus* (78.9% и 5.2%, соответственно). Другие штаммы имели меньшие различия в показателях идентификации или только небольшое число изолятов. Показатели идентификации до вида для коагулаза-отрицательных стафилококков (CoNS) были 169 (75,8%), 194 (87,0%) и 117 (52,5%) для стандартной экстракции, экстракции на мишени и метода прямого нанесения соответственно.

Время, требующееся для каждого метода. Среднее время, требующееся для 48 двойных образцов (24 изолята) в каждой процедуре было: 30 минут для метода прямого нанесения, 60 минут для метода экстракции на мишени и 180 минут для метода стандартной экстракции.

Ошибочные или противоречивые идентификации. Не было сделано ошибочных идентификаций, но было 5 противоречивых результатов (Таблица 2).

| Таблица 2 Штаммы с несогласующейся идентификацией различными методами | | | | | | | | |
|---|--------|-------|--|---------|---------------------------------|---------|-------------------------------|--------|
| Организм | Штамм | Эксп. | Идентификация и числовое значение достоверности идентификации (ЧЗДИ) | | | | | |
| | | | Стандартная экстракция | | Экстракция на мишени | | Прямое нанесение | |
| | | | Идентификация | ЧЗДИ | Идентификация | ЧЗДИ | Идентификация | ЧЗДИ |
| <i>Staphylococcus caprae</i> | 54709 | 1 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 2.051 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 2.188 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 1.797* |
| | | 2 | <i>Staphylococcus pasteurii</i> | 1.909** | <i>Staphylococcus caprae</i> | 2.015 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 1.802* |
| | PG1037 | 1 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 2.105 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 2.162 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 1.876* |
| | | 2 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1.741** | <i>Staphylococcus caprae</i> | 2.137 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 1.751* |
| | PG2043 | 1 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 2.014 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 2.16 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 1.888* |
| | | 2 | <i>Staphylococcus pasteurii</i> | 1.882** | <i>Staphylococcus caprae</i> | 2.123 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 2.094 |
| | PG2075 | 1 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 1.749* | <i>Staphylococcus caprae</i> | 2.22 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 1.909* |
| | | 2 | <i>Staphylococcus pasteurii</i> | 1.703** | <i>Staphylococcus caprae</i> | 2.076 | <i>Staphylococcus caprae</i> | 1.999* |
| <i>Staphylococcus warneri</i> | 54826 | 1 | <i>Staphylococcus warneri</i> | 2.04 | <i>Staphylococcus pasteurii</i> | 1.841** | <i>Staphylococcus warneri</i> | 1.812* |
| | | 2 | <i>Staphylococcus warneri</i> | 2.084 | <i>Staphylococcus warneri</i> | 1.889 | Unreliable identification | 1.64 |

*, идентификация на уровне рода с корректной идентификацией на уровне вида; **, идентификация на уровне рода с противоречивой идентификацией на уровне вида.

Дендрограмма. Со штаммами, которые показали противоречивые результаты, и соответствующими эталонными штаммами, которые были установлены в Biotyper 3.0, была создана дендрограмма (Рис. 1). Белковые профили штаммов *S. caprae*, полученные стандартным методом экстракции, входили в состав кластера с *S. epidermidis* CCM4505 и *S. pasteurii* DSM 10656^T. Напротив, профили, полученные методами прямого нанесения и экстракции на мишени, были тесно связаны с профилем *S. caprae* DSM 20608^T (Рис. 1.) Профили *S. warneri* 54826, определенные этими тремя методами, кластеризовались в ту же группу, как и профиль *S. warneri* DSM 20316^T.

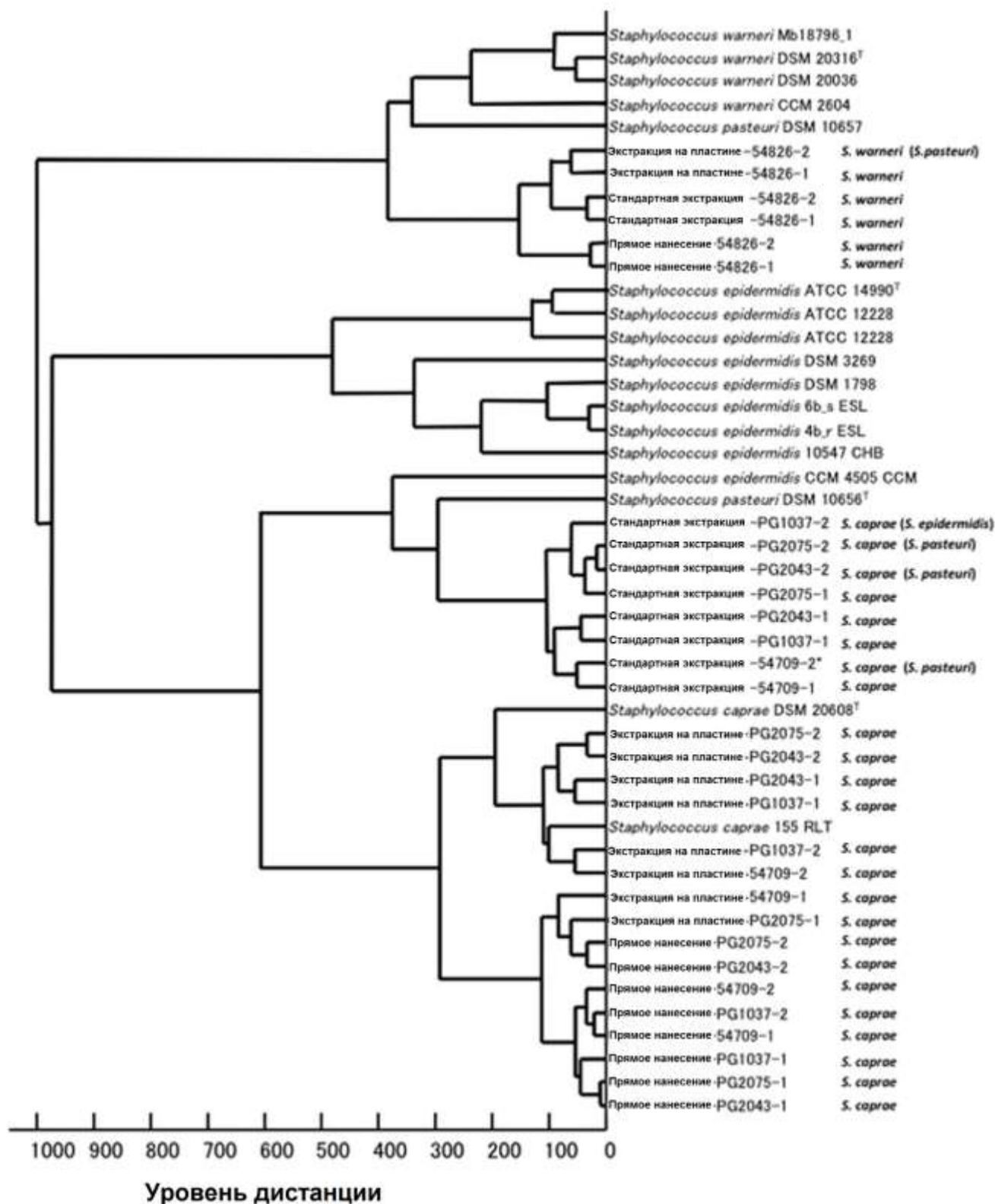


Рисунок 1. Дендрограмма, полученная на основе МАЛДИ-ТОФ МС – специфичных белковых профилей для штаммов с противоречивыми результатами идентификации, включающая профили *S. warneri*, *S. pasteurii*, *S. epidermidis* и *S. caprae* из базы данных MALDI Biotyper 3.0. Названия видов в этом исследовании, определенные по последовательности гена *sodA*, показаны после названий образцов. Дополнительные виды в круглых скобках – противоречивые виды, определенные с помощью идентификации, основанной на МАЛДИ-ТОФ. Значения дистанции являются относительными и нормализованы к максимальному значению 1000.

Обсуждение

Поскольку метод МАЛДИ-ТОФ МС был впервые применен для идентификации микроорганизмов еще в 1975 (2), эту систему для лабораторий клинической микробиологии усовершенствовали до уровня высокопроизводительного прибора (3, 4, 24). Недавно была описана прямая идентификация с помощью МАЛДИ-ТОФ МС положительных гемокультур с показателем идентификации до вида 91% (13). Улучшения программного обеспечения Biotyper 3.0 и его баз данных могут изменить рабочий поток лаборатории клинической микробиологии (5,6).

Для идентификации бактерий, основанной на МАЛДИ-ТОФ МС, производителем было предложено 2 метода пробоподготовки. Один из них – метод прямого нанесения, который подходит для рутинных рабочих потоков в современной микробиологической лаборатории, характеризующийся коротким временем выполнения (менее 30-ти минут на 48 образцов) и простой процедурой. Однако этот метод имеет недостаток - низкий показатель идентификации, особенно для грамположительных бактерий (1,5). Bizzini et al. сообщает о показателях идентификации при методе прямого нанесения, равном: для *Streptococcus agalactiae* - 58%, *Streptococcus pneumoniae* - 73%, *S. aureus* - 79%, и *S. epidermidis* - 58%, при использовании программного обеспечения MALDI Biotyper 2.0 (4). В данном исследовании мы использовали программное обеспечение MALDI Biotyper 3.0 и получили при помощи метода прямого нанесения лишь немного более высокие показатели идентификации, например, 87.5% и 68.8%, соответственно, для *S. aureus* и *S. epidermidis*. Наши более высокие показатели идентификации могут быть связаны с улучшением версии программного обеспечения Biotyper.

Другой метод, метод стандартной экстракции, был использован в создании баз данных для системы Biotyper и был рекомендован производителем как эталонный метод идентификации (1, 4, 7). В данном исследовании, показатели идентификации для метода стандартной экстракции были 80,8% на уровне вида, что лучше, чем сообщалось ранее (1). Различия показателей идентификации между различными исследованиями может объясняться различиями в условиях выращивания, подготовке образцов, числе эталонных штаммов, версиях программного обеспечения Biotyper и дизайне исследования (3). В нашем протоколе метод стандартной экстракции состоял приблизительно из 13 шагов, включая выполнение 2 циклов центрифугования по 2 минуты каждый, и требовал 180 минут для 48 образцов. Поскольку это трудно автоматизировать, рутинное использование метода стандартной экстракции не может подойти для первичной пробоподготовки (1, 4). Метод стандартной экстракции можно использовать как эталонный в случаях, когда метод экстракции на мишени или метод прямого нанесения не могут идентифицировать виды.

Метод экстракции на мишени обеспечивает преимущества простой и легко осуществляемой процедуры. Он требует только 4 шага и 60 минут для полной идентификации 48 образцов. Показатели идентификации бактерий, достигаемые методом экстракции на мишени, были, по крайней мере, равны показателям, достигнутым с использованием метода стандартной экстракции. Мы обнаружили, что *S. aureus* имеет более высокий показатель идентификации, чем коагулаза-отрицательные стафилококки. Для установления причины этих различий необходимы дальнейшие исследования.

Показатели идентификации для *S. caprae* и *S. saprophyticus* при использовании метода экстракции на мишени оказались выше, чем при использовании метода стандартной экстракции. Другие виды показали меньшие различия в идентификации между методом экстракции на мишени и методом стандартной экстракции. Это означает, что для некоторых видов стафилококков метод экстракции на мишени может иметь лучшие показатели идентификации, чем метод стандартной экстракции. Наш протокол полного высушивания образцов для стандартной экстракции при 55°C может это объяснить. Этот метод может приводить к деградации белков, сдвигающей белковый профиль, используемый для идентификации. Если бы мы выбрали другой протокол, включающий время высушивания 10 минут при комнатной температуре, то общее время, требующееся для экстракции белков, могло бы быть сокращено, потенциально обеспечивая лучшие показатели идентификации для стандартной экстракции.

Более того, метод экстракции на мишени, по сообщению Haigh et al. (16), может быть усовершенствован. Авторы этой работы представили метод, который не использует ацетонитрил, продемонстрировав 10,9% улучшение в показателях идентификации на уровне вида для различных клинических штаммов (16). Более короткий метод существенно поможет в распространении бактериальной идентификации, основанной на МАЛДИ-ТОФ.

В полученных данных имеются 5 противоречивых результатов. *S. caprae* был идентифицирован как *S. pasteurii* и *S. epidermidis* в эксперименте 2 при использовании метода стандартной экстракции (Таблица 2). *S. warneri* был идентифицирован как *S. pasteurii* в эксперименте 1 при использовании метода экстракции на мишени. Согласно результатам на основе базы данных MALDI Biotyper 3.0, дендрограммы белковых профилей для стандартных экстракций 4 штаммов *S. caprae* показали кластеризацию с *S. epidermidis* CCM4045 и *S. pasteurii* DSM10656^T и отделение от кластера с *S. caprae* DSM 20608^T (Рис. 1). Белковый профиль *S. warneri* DSM 20316^T был тесно связан с профилем *S. pasteurii* DSM10657 но был отделен от профиля *S. pasteurii* DSM10656^T. Это несоответствие филогении между профилем МАЛДИ-ТОФ МС и последовательностью *sodA* может обуславливать несогласованные результаты, полученные в нашем эксперименте. Подобным же образом, тесное генетическое и белковое родство между *S. pasteurii* и *S. warneri* могло привести к противоречивым результатам с *S. warneri* 54826. MALDI Biotyper 3.0 включает в качестве эталонов только 2 штамма *S. caprae*, в то время как для *S. warneri* имеются 4 эталонных штамма и для *S. epidermidis* – 9 (Таблица 1). Это малое число эталонных штаммов может ограничить точность при определении *S. caprae*. Действительно, Seng et al. ранее описывал корреляцию между точностью идентификации методом МАЛДИ-ТОФ МС и числом эталонных штаммов (22). Подобные наблюдения были описаны несколькими другими исследователями (1, 18). В дальнейшем Lista et al. показали, что дополнительные эталонные штаммы должны более аккуратно представлять генетическое разнообразие штамма (19). Поэтому представители с различным генетическим фоном для каждого вида должны улучшить показатели идентификации на уровне видов. Будущие исследования с использованием усовершенствованной и расширенной базы данных должны решить эту проблему.

В заключение: Мы продемонстрировали, что метод экстракции на мишени обеспечивает показатели идентификации на уровне вида, по крайней мере, эквивалентные результатам метода стандартной экстракции. При этом метод экстракции на мишени обеспечивает следующие преимущества: удобство, более короткое время выполнения и значительно лучшие показатели идентификации при анализе стафилококков, чем метод прямого нанесения.

Благодарности

Это исследование было частично поддержано грантом по оказанию помощи (S0991013) Министерства образования, культуры, спорта, науки и технологий, Япония (MEXT), для Фонда проектов стратегических исследований в частных университетах.

Ссылки

1. Alatoon AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. 2011. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **49**:2868–2873.
2. Anhalt JP, Fenselau C. 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem.* **47**:219–225. 3. Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One* **6**:e16424. doi: 10.1371/journal.pone.0016424.
4. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'homme G. 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **48**:1549–1554.
5. Bizzini A, Greub G. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**:1614–1619.
6. Bizzini A, et al. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J. Clin. Microbiol.* **49**:693–696.
7. Carbonnelle E, et al. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin. Biochem.* **44**:104–109.
8. Cherkaoui A, et al. 2010. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J. Clin. Microbiol.* **48**:1169–1175.
9. Dhiman N, Hall L, Wohlfel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. 2011. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J. Clin. Microbiol.* **49**:1614–1616.
10. Dubois D, et al. 2010. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **48**:941–945.

11. **Dupont C, et al.** 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.
12. **Eigner U, et al.** 2009. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin. Lab.* **55**:289–296.
13. **Ferroni A, et al.** 2010. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **48**:1542–1548.
14. **Friedrichs C, Rodloff AC, Chhatwal GS, Schellenberger W, Eschrich K.** 2007. Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2392–2397.
15. **Gaillot O, et al.** 2011. Cost-effectiveness of switch to matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for routine bacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* **49**:4412.
16. **Haigh J, Degun A, Eydmann M, Millar M, Wilks M.** 2011. Improved performance of bacterium and yeast identification by a commercial matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **49**:3441.
17. **Konrad R, et al.** 2010. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. *Euro Surveill.* **15**(43):pi_19699.
18. **Lartigue MF, et al.** 2009. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **47**:2284–2287.
19. **Lista F, et al.** 2011. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiol.* **11**:267.
20. **Poyart C, Quesne G, Boumaila C, Trieu-Cuot P.** 2001. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4296–4301.
21. **Saffert RT, et al.** 2011. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **49**:887– 892.
22. **Seng P, et al.** 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-offlight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* **49**:543–551.
23. **Sivadon V, et al.** 2004. Use of *sodA* sequencing for the identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:939–942.
24. **van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ.** 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.