

# Применение и развитие исследований технологии MALDI-TOF в Китае

**Lu Xin Xin** доктор медицины/проф./микробиолог  
Пекинская больница Тонгрэн, Столичный медицинский  
университет, Кафедра офтальмологии  
Москва, 1 марта 2024

## Основное содержание

- ★ Клиническая микробиология в Китае
- ★ Масс-спектрометрия MALDI-TOF в клинической лаборатории

## 1. Общая информация по клинической микробиологии

Тип больницы	Количество	Традиционные методы	ПЦР	MALDI-TOF MS	Сиквенс ДНК	mNGS*	Кол-во образцов/день
Специализированные, хорошо оснащённые больницы высокого класса	Около 4 000	Рутинно	Рутинно	Почти все с 2010 г.	1/2, LDT**	1/10, LDT	100 - 300
Больницы среднего уровня	Более 10 000	Рутинно	Почти все	1/4, быстрый рост	КЛ***	КЛ	30 - 80
Частные клиники	Более 20 000	Частично	Частично	Частично, быстрый рост	КЛ	КЛ	10 - 50
Центры по контролю и профилактике	3 700	Специализированные	Специализированные	Частично	LDT	LDT	Варьирует

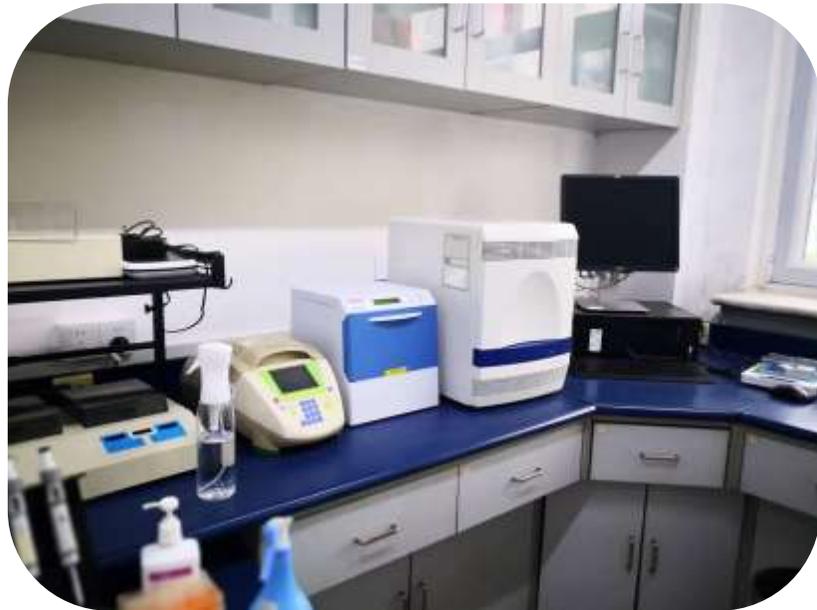
\*mNGS – метагеномное секвенирование нового поколения; \*\*LDT – Лабораторный тест in vitro диагностики, используемый в рамках одной клинической лаборатории, отвечающей определённым требованиям; \*\*\* КЛ – коммерческая лаборатория

## Медицинская лаборатория в крупной больнице



Автоматизация очень популярна в крупных медицинских лабораториях

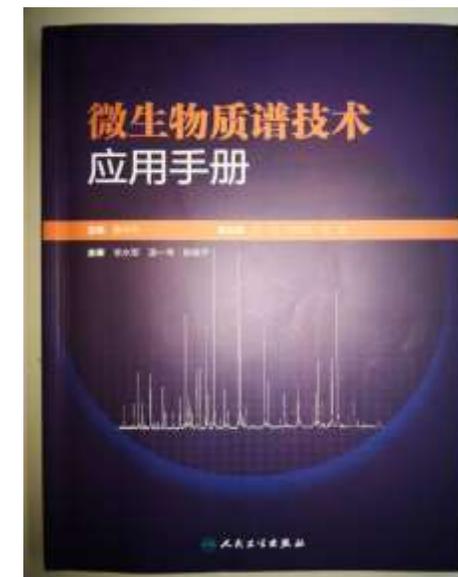
## Лаборатория с небольшим потоком образцов



Специализированные лаборатории: офтальмологии, отделения инфекционных заболеваний и т.д.

## 2. Последние разработки в области MALDI-TOF MS

- Усовершенствование аппаратных средств, управляющего программного обеспечения и алгоритмов
- Метод белковой экстракции
- Функция самостоятельного создания библиотеки
- Разработка приложений
  - Определение лекарственной устойчивости бактерий
  - Метод кластерного анализа
  - Режим отрицательных низкомолекулярных ионов



Руководство по применению MALDI-TOF MS в лаборатории клинической микробиологии

鉴定结果

文件名	靶点	样...	条形码	属(Genus)	种(Sp...	株(Strain)	中文名	得分(3分制)	得分(100分制)
B11_153920_ESCHERICHIA COLI_NULL_SCORE1.66.M...	B11			Escherichia	coli	Strain102520	大肠埃希菌	1.66	58.6
C3_152245_HAFNIA ALVEI_NULL_SCORE1.61.MTD	C3			Hafnia	Alvei	Strain102799	蜂房哈夫...	1.61	56.8
C3_152259_Actinomyces coleocanis_NULL_Score1.55....	C3			Actinomyces	coleo...	Strain100235	狗阴道放...	1.55	54.7
C6_165232_Cedecea neteri_NULL_Score1.48.mtd	C6			Cedecea	neteri	Strain101668	奈氏西地...	1.47	51.9
C7_141851_Cedecea neteri_NULL_Score1.33.mtd	C7			Cedecea	neteri	Strain101668	奈氏西地...	1.33	46.9
C9_151550_Aggregatibacter aphrophilus_NULL_Scor...	C9			Aggregatibac...	aphr...	Strain530022	嗜沫凝聚...	1.53	54.0
C11_153943_Ochrobactrum haematophilum_NULL_S...	C11			Ochrobactrum	haem...	Strain520138	嗜血苍白...	1.54	54.4
D4_142020_Sodalis glossinidius_NULL_Score1.66.mtd	D4			Sodalis	glossi...	Strain105321	舌蝇和膝菌	1.66	58.6
E10_154745_Sodalis glossinidius_NULL_Score1.60.mtd	E10			Sodalis	glossi...	Strain105321	舌蝇和膝菌	1.60	56.5
H3_185447_Citrobacter braakii_NULL_Score1.46.mtd	H3			Citrobacter	braakii	Strain101706	布氏柠檬...	1.46	51.5
H12_094528_Citrobacter braakii_NULL_Score1.53.mtd	H12			Citrobacter	braakii	Strain101706	布氏柠檬...	1.53	54.0
H12_094551_Escherichia vulneris_NULL_Score1.57.mtd	H12			Escherichia	vulne...	Strain102538	伤口埃希菌	1.57	55.4

Отсутствует функция интеллектуальной коррекции оси масс

鉴定结果

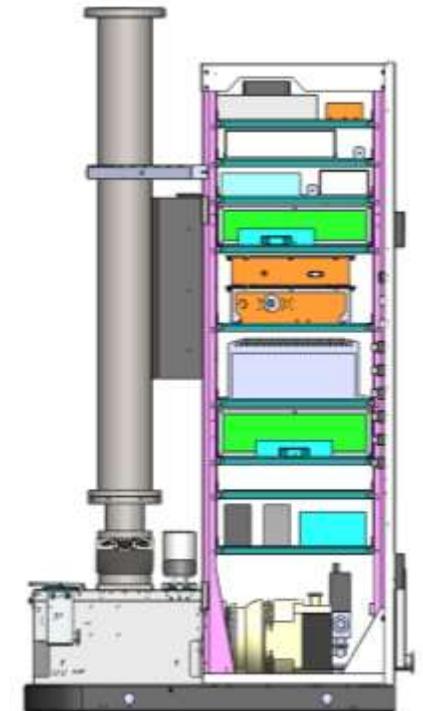
文件名	靶点	样...	条形码	属(Genus)	种(Sp...	株(Strain)	中文名	得分(3分制)	得分(100分制)
B11_153920_ESCHERICHIA COLI_NULL_SCORE1.66.M...	B11			Escherichia	coli	Strain102508	大肠埃希菌	2.42	94.2
C3_152245_HAFNIA ALVEI_NULL_SCORE1.61.MTD	C3			Escherichia	coli	Strain530001	大肠埃希菌	2.30	93.0
C3_152259_Actinomyces coleocanis_NULL_Score1.55....	C3			Escherichia	coli	Strain530001	大肠埃希菌	2.43	94.3
C6_165232_Cedecea neteri_NULL_Score1.48.mtd	C6			Escherichia	coli	Strain530001	大肠埃希菌	2.09	90.9
C7_141851_Cedecea neteri_NULL_Score1.33.mtd	C7			Escherichia	coli	Strain530001	大肠埃希菌	2.21	92.1
C9_151550_Aggregatibacter aphrophilus_NULL_Scor...	C9			Escherichia	coli	Strain530001	大肠埃希菌	2.11	91.1
C11_153943_Ochrobactrum haematophilum_NULL_S...	C11			Escherichia	coli	Strain530001	大肠埃希菌	2.05	90.5
D4_142020_Sodalis glossinidius_NULL_Score1.66.mtd	D4			Escherichia	coli	Strain102508	大肠埃希菌	2.28	92.8
E10_154745_Sodalis glossinidius_NULL_Score1.60.mtd	E10			Escherichia	coli	Strain102508	大肠埃希菌	2.33	93.3
H3_185447_Citrobacter braakii_NULL_Score1.46.mtd	H3			Escherichia	coli	Strain530001	大肠埃希菌	2.25	92.5
H12_094528_Citrobacter braakii_NULL_Score1.53.mtd	H12			Escherichia	coli	Strain530001	大肠埃希菌	2.38	93.8
H12_094551_Escherichia vulneris_NULL_Score1.57.mtd	H12			Escherichia	coli	Strain530001	大肠埃希菌	2.42	94.2

После коррекции

## 2.1 Совершенствование аппаратных средств, управляющего программного обеспечения и алгоритмов

Аппаратное средство постоянно обновляется, например:

- ✓ **Электронное управление:** Система управления FPGA+ARM используется для обеспечения стабильности напряжения, унификации последовательного порта (USB) и повышения скорости передачи данных
- ✓ **Детектор:** Оснащён двухканальной картой сбора данных MCP, достигает частоты выборки 2 ГГц и улучшает разрешение
- ✓ **Лазер:** Твердотельный лазер с 20 миллиардами выстрелов
- ✓ **Камера для образцов:** Оснащена механизмом подъёма мишени с независимым двигателем, что обеспечивает дистанционное обслуживание и помогает предотвратить износ. Время ввода мишени составляет <30 секунд.



## 2.2 управляющая система: Одновременное проведение клинических и научных исследований

ПЗС-изображение высокого разрешения; 500-кратное увеличение; автоматическое/ручное получение

The screenshot displays a complex software interface for sample analysis. On the left, there is a grid of 12 sample wells (A-D, E-H) with various colored indicators. Below the grid is a control panel with buttons for 'Start', 'Stop', and 'Record'. In the center, there is a 'Morphology Database' window showing a red circular image of a sample and associated text. To the right, there are two mass spectra plots showing intensity versus m/z, with several peaks labeled with their m/z values. At the bottom right, there is a table with columns for 'Retention Time', 'Molecular Weight', 'Abundance', and 'Identification'. The interface is in Chinese and includes various settings and data entry fields.

Морфологическая база данных

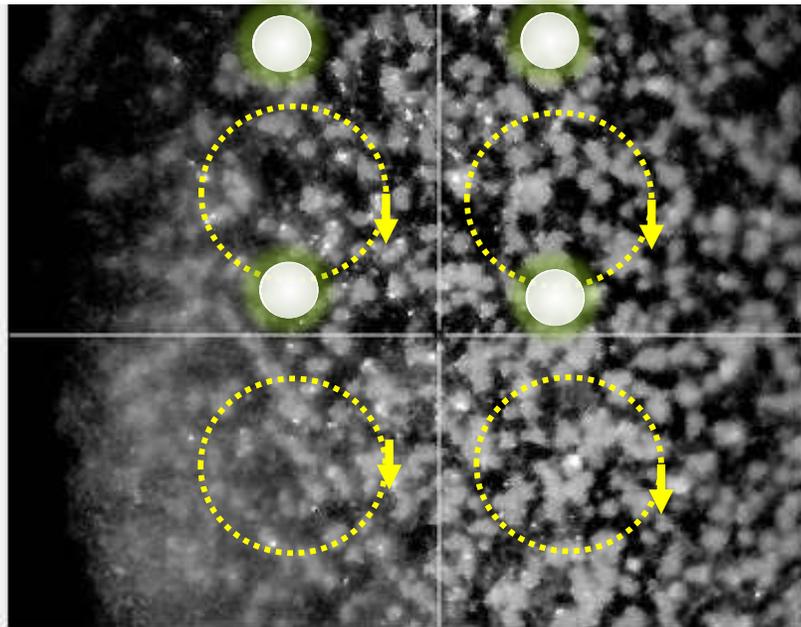
Получение, поиск и идентификация интегрированы. Спектры могут быть загружены напрямую.

Предварительный просмотр спектров

Время анализа для идентификации: 96 изолятов только за 8 минут

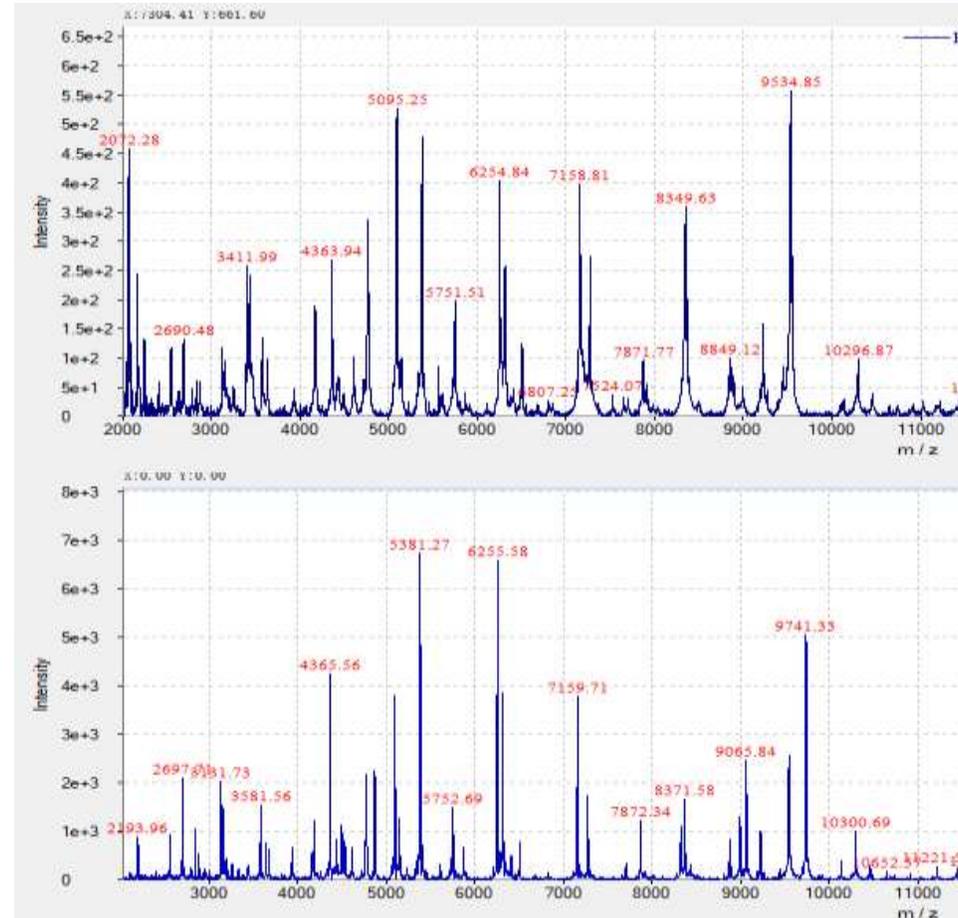
## 2.3 Функция сбора данных при сканировании

Принцип: точка попадания лазера будет совершать круговые движения на заданной скорости и траектории при каждом выстреле



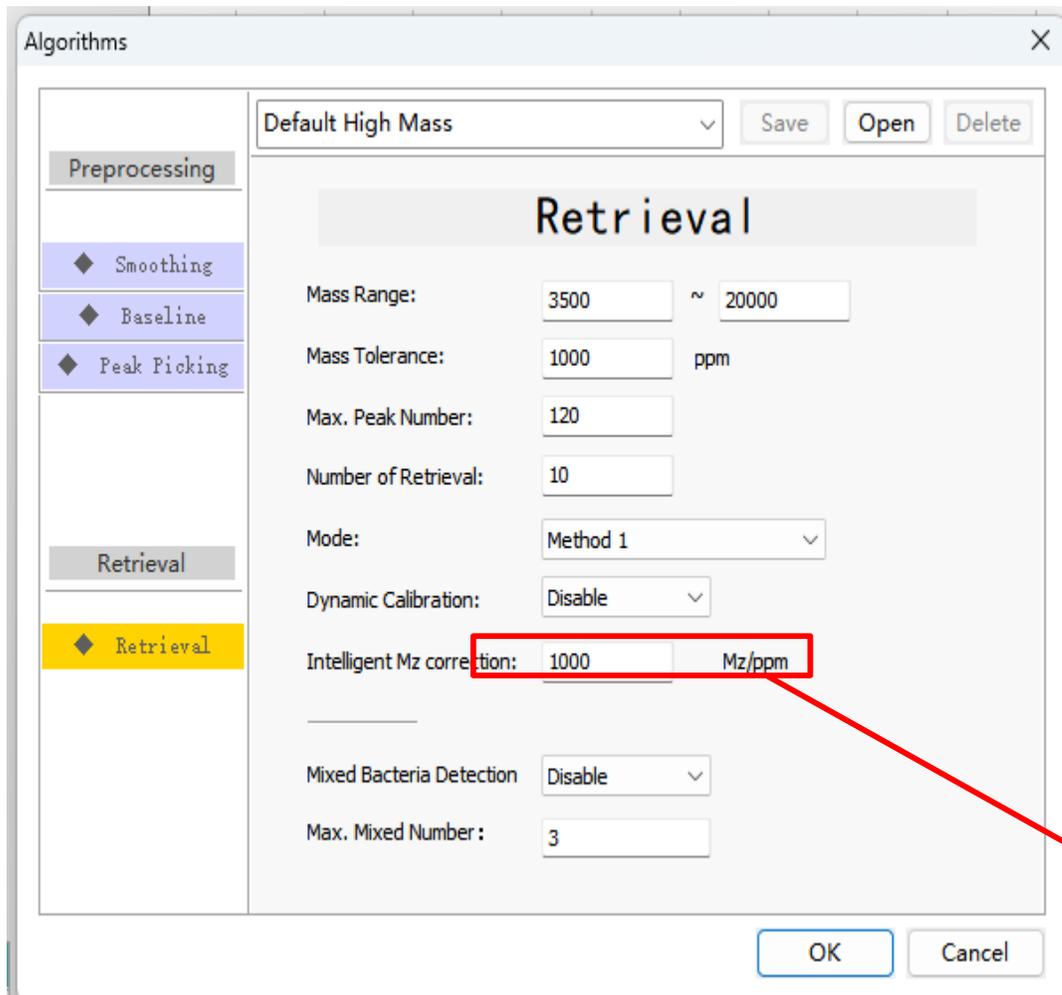
Траектория движения

Пятно лазера



- ✓ Повышение чувствительности
- ✓ Сокращение числа использований лазера, уменьшение загрязнения ионного источника и продление срока службы прибора
- ✓ Повышение стабильности и точности идентификации

## 2.4 Функция автоматической калибровки Smart



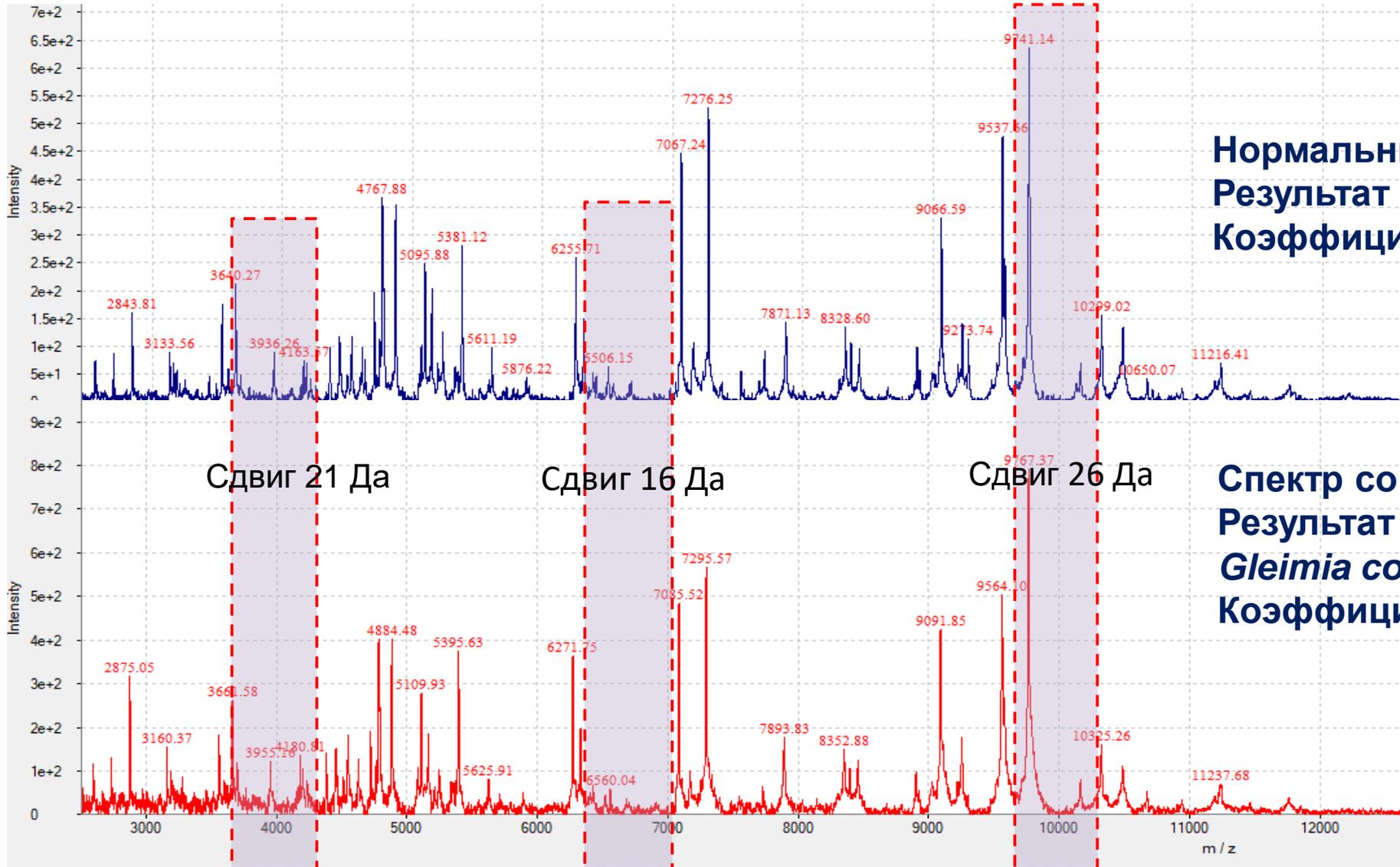
### ■ Пик массы M/S спектра может смещаться при следующих обстоятельствах:

- ① Электрическое поле неоднородно
- ② Неровная поверхность мишени
- ③ Кристаллизация образца неравномерна
- ④ Если мощность лазера слишком высока, ось масс будет смещаться из-за снижения разрешения
- ⑤ Качественная калибровка не проводилась в течение длительного времени

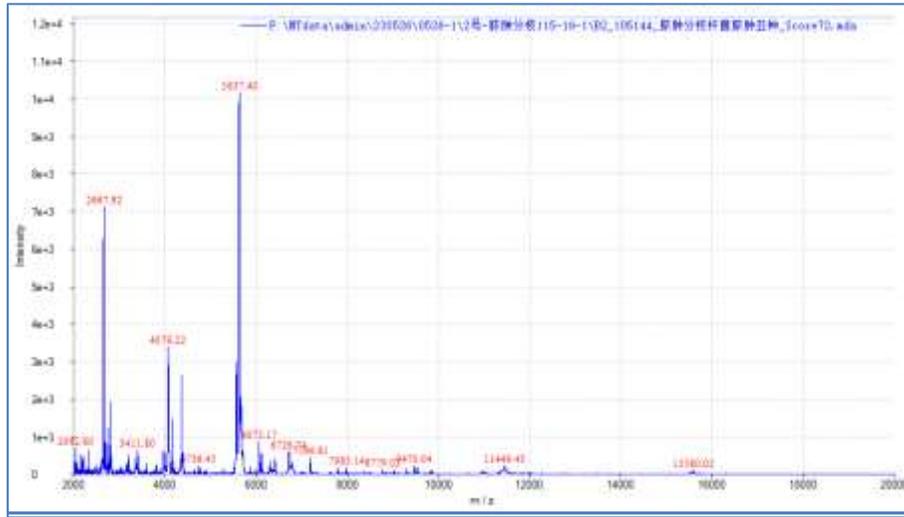
□ Функция позволяет автоматически идентифицировать вышеупомянутый сдвиг, минимизировать требования по добавлению образца на мишень и обеспечить точность результатов идентификации.

### Смещение:

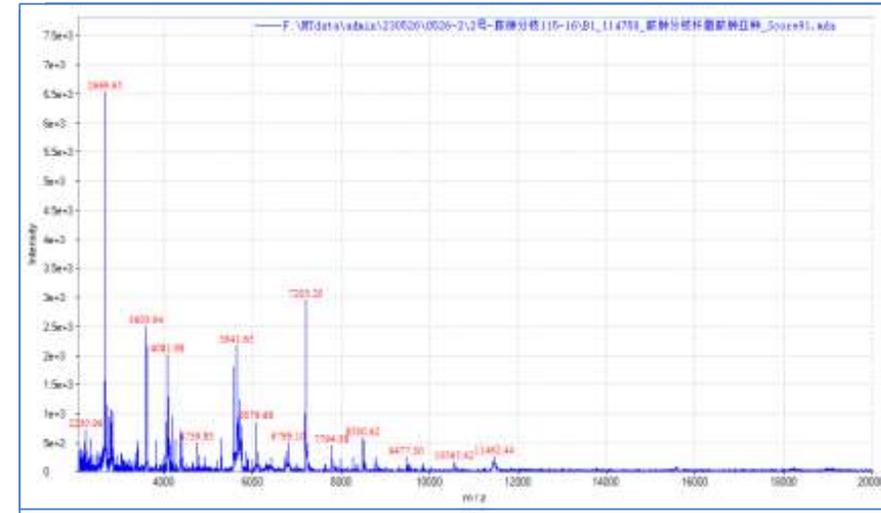
Если  $\leq 20$ , автоматическая коррекция будет выполняться в соответствии с максимальной массой смещения (M/Z)  
Если  $>20$ , автоматическая коррекция будет выполняться на основе максимального относительного отклонения в ppm



## 2.5 Метод белковой экстракции



Без обработки ультразвуком, *Mycobacterium* spp.



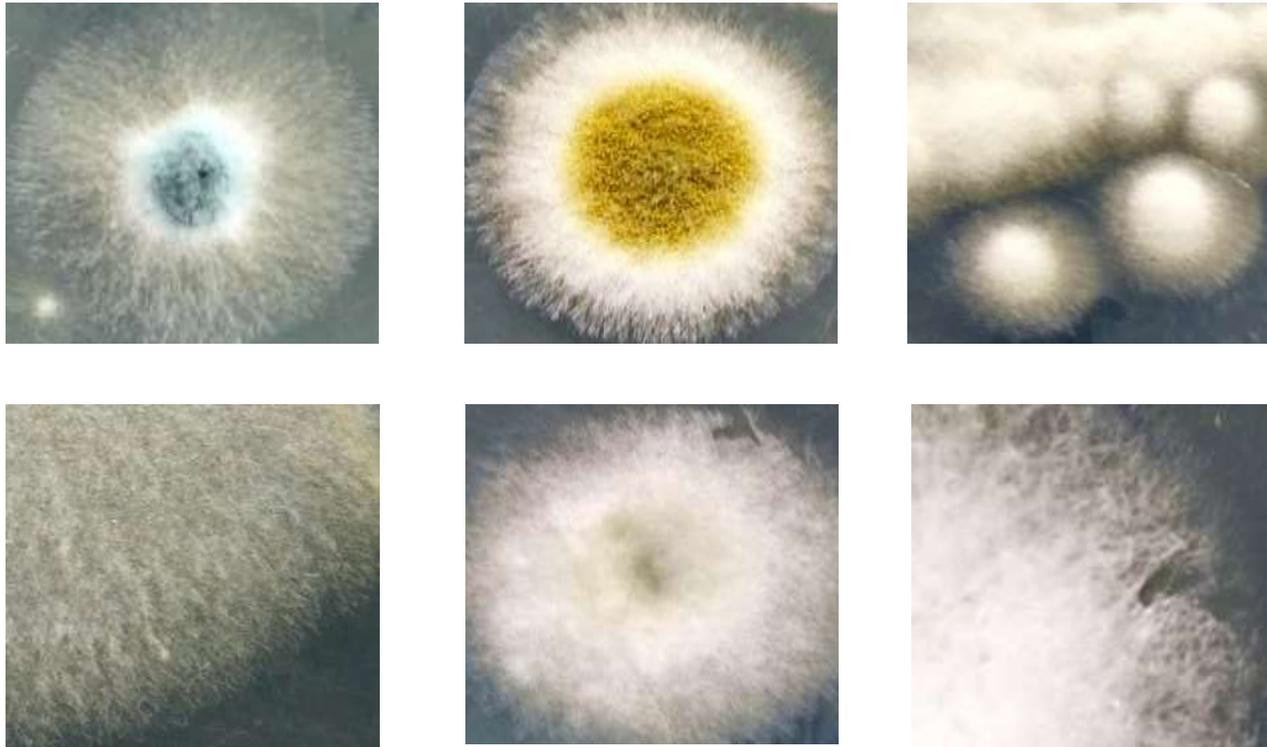
Обработка ультразвуком, *Mycobacterium* spp.

★**1й этап:** Добавьте 300 мкл стерильной воды в центрифужную пробирку типа Эппендорф с магнитными бусинами, перенесите свежие колонии грибов в пробирку и тщательно суспендируйте. Добавьте 900 мкл безводного этанола, перемешайте и хорошо встряхните, затем центрифугируйте при 12000 об/мин в течение 3 мин, удалите супернатант и дайте остаткам жидкости полностью испариться.

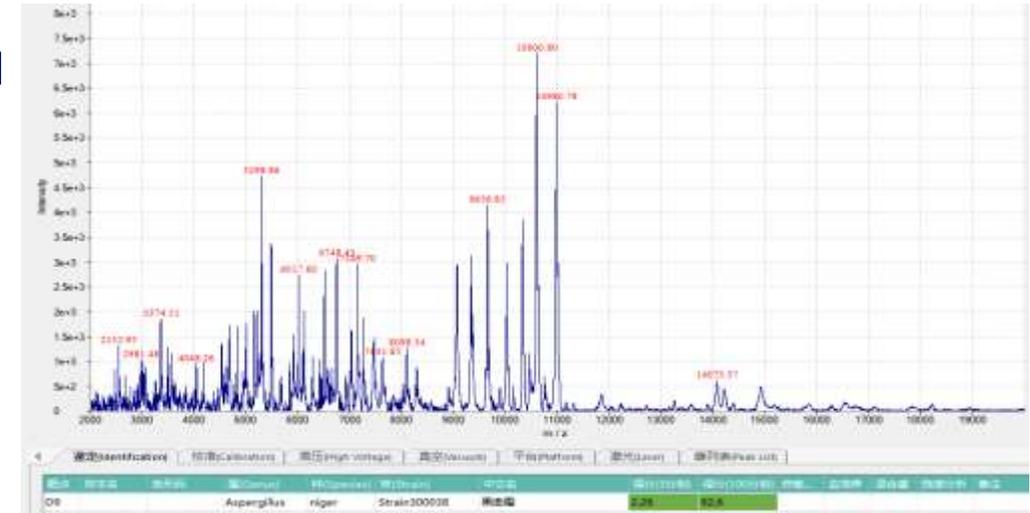
★**2й этап :** Добавьте 20 мкл 70% муравьиной кислоты к осадку, перемешайте и **обработайте ультразвуком 10-15 мин.** Добавьте 20мкл ацетонитрила, перемешайте и хорошо встряхните, затем центрифугируйте при 12000 об/мин 1 мин.

★**3й этап:** Нанесите 1мкл супернатанта на мишень, высушите на воздухе при комнатной температуре, нанесите на образец 1 мкл матрицы, высушите на воздухе и проанализируйте.

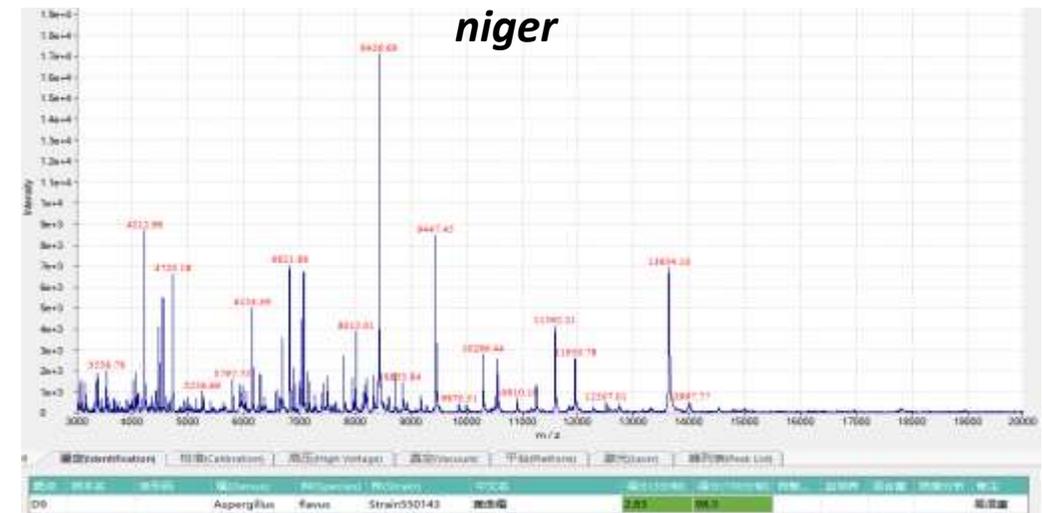
# Хорошая идентификация незрелых колоний



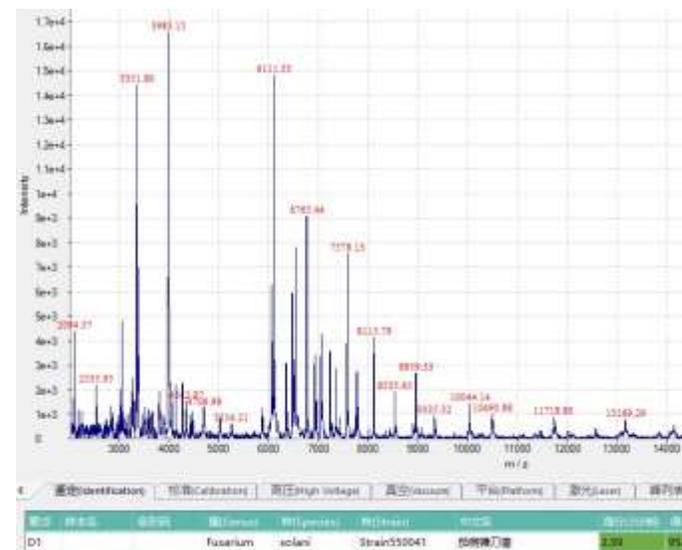
Мицелиальные грибы



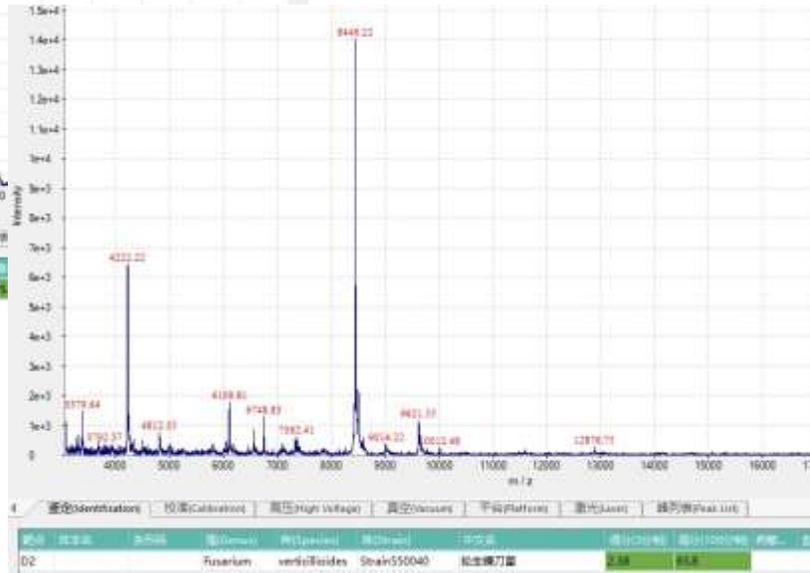
*Aspergillus niger*



*Aspergillus flavus*

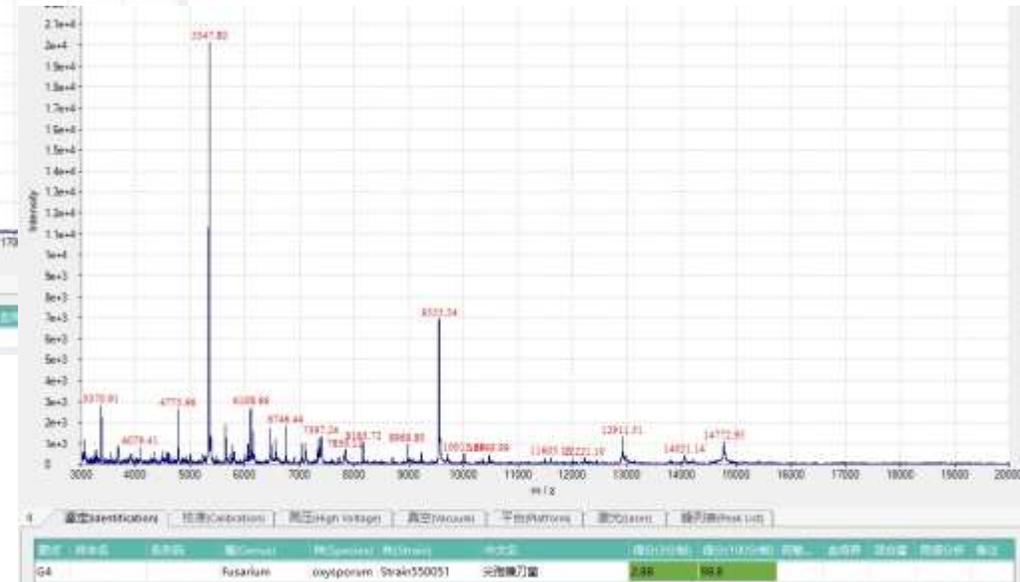


*Fusarium solani*



*Fusarium verticillioides*

Высококачественная масс-спектрометрическая идентификация мицелиальных грибов



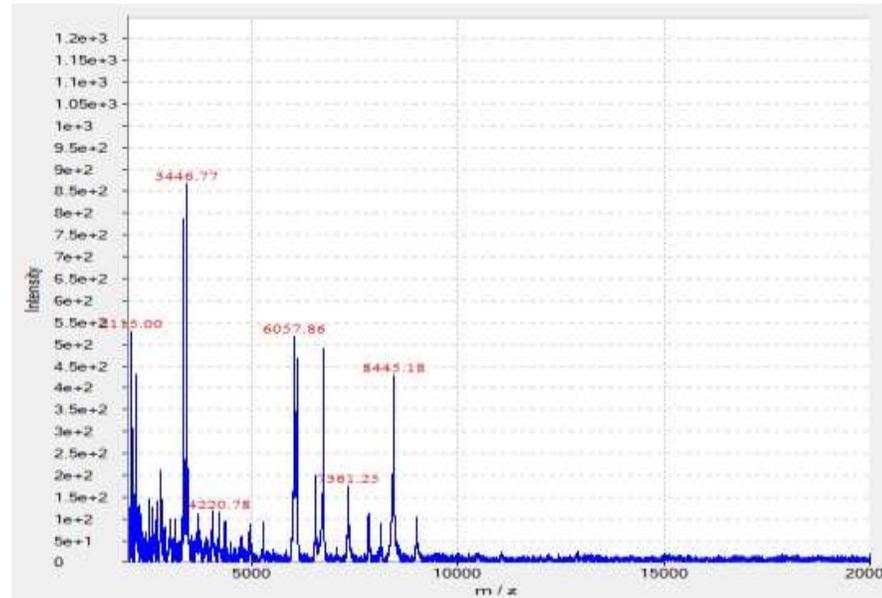
*Fusarium oxysporum*

## Быстрая идентификация мицелиальных грибов

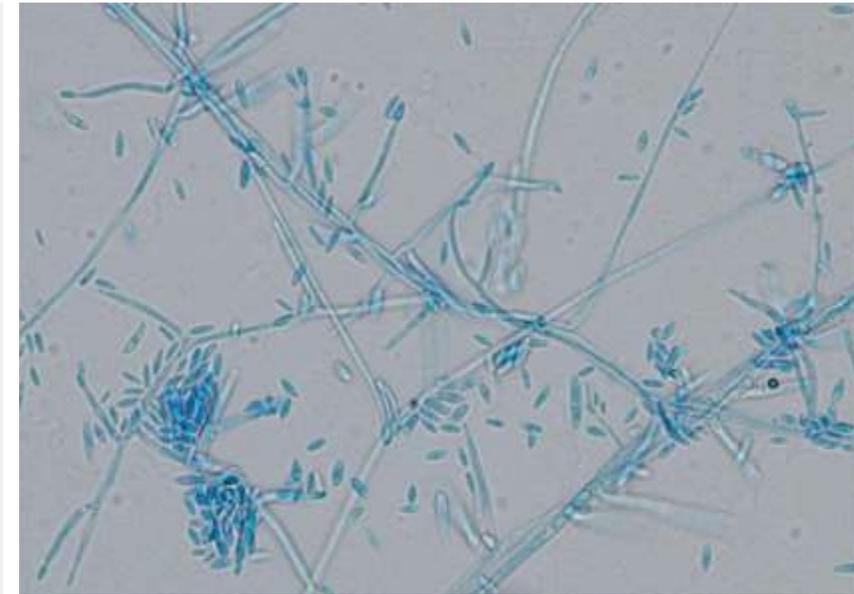
Только 1µl муравьиной кислоты и тщательно измельчить + 1µl матрицы



18ч культура с соскоба с роговицы

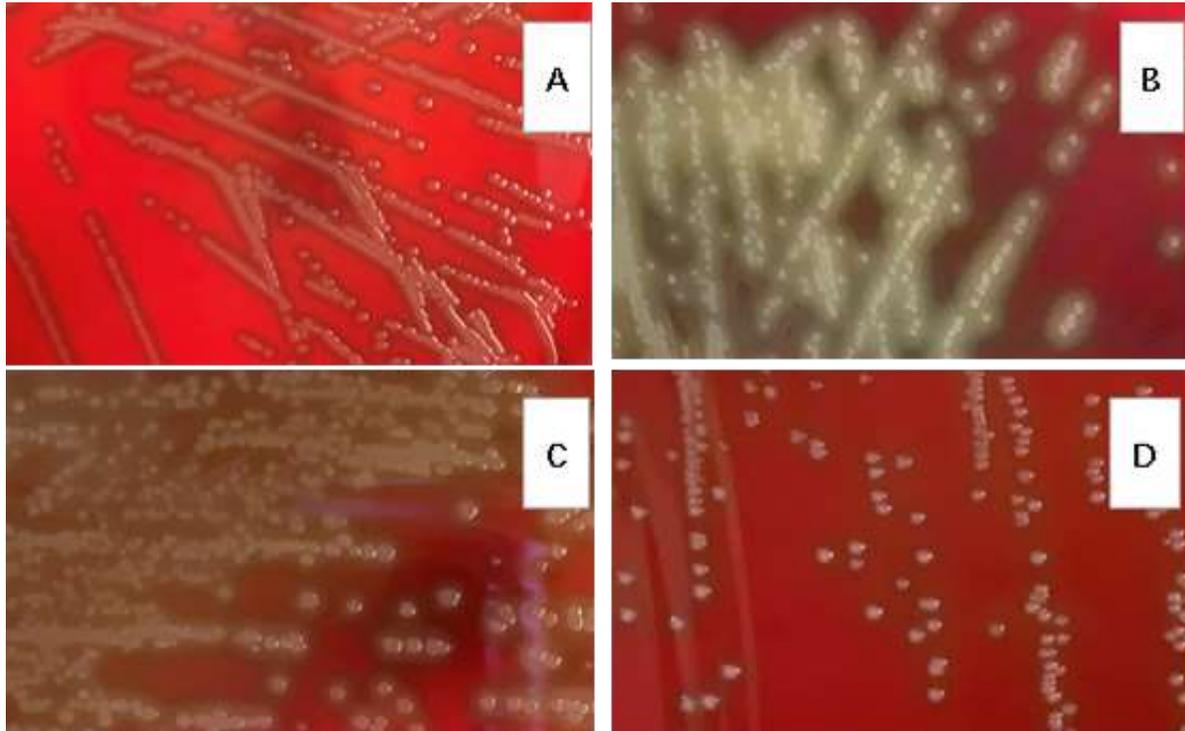


*Fusarium verticillioides* 2.10

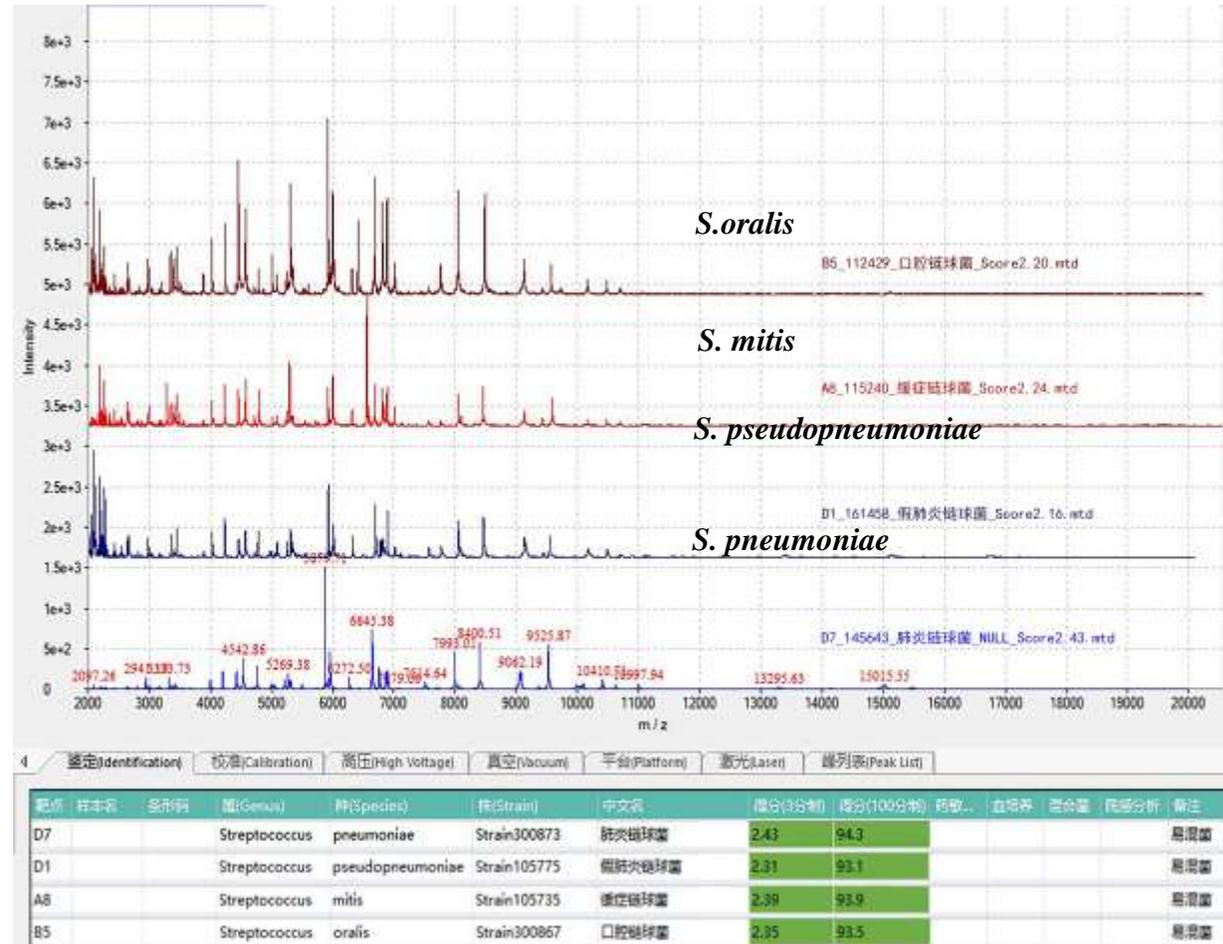


Через 4 дня под микроскопом

# Легко отличить близкородственные бактерии



*S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*



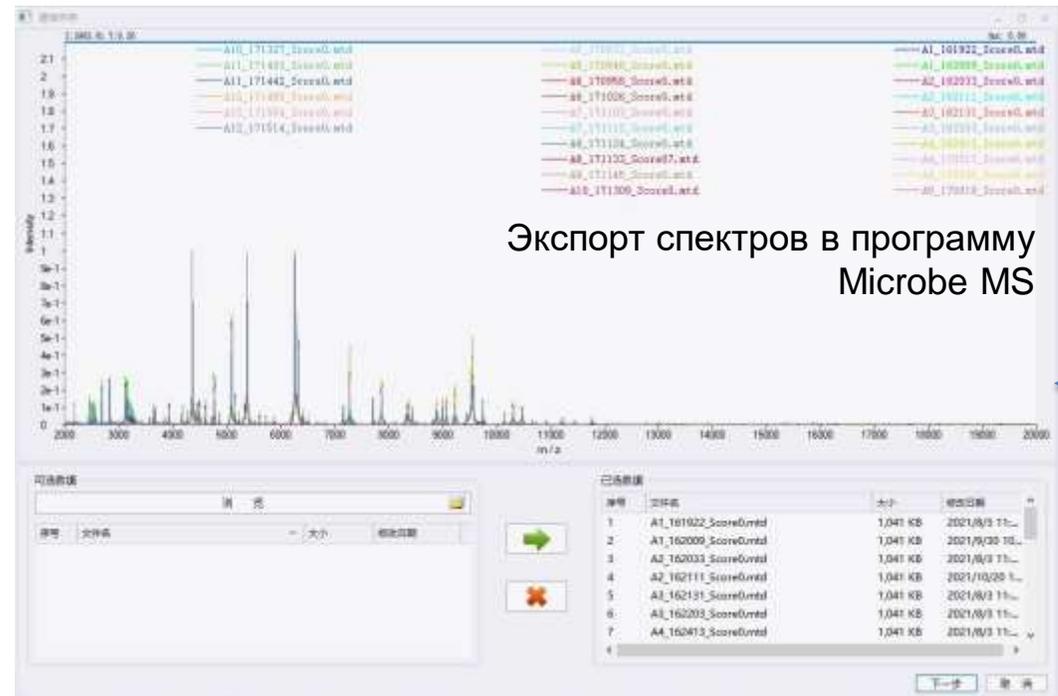
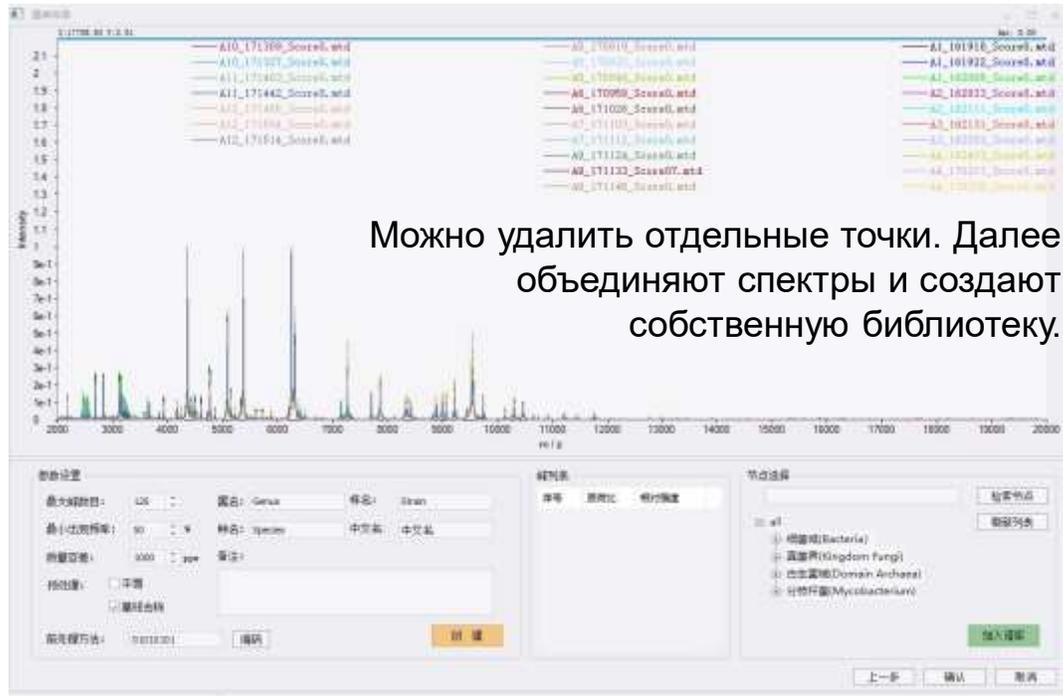
# Функция создания собственной библиотеки

После секвенирования субкультивируют штаммы для получения чистых колоний

Белковая экстракция

Приготовьте контроль *E.coli* ATCC8739

Образец помещают параллельно на 15 ячеек и используют фиксированный режим лазера для получения 30 спектров, дважды снимая спектры по каждой ячейке. Спектры должны быть с большим количеством равномерно распределённых белковых пиков, с хорошей формой пика, соответствующей интенсивностью сигнала, высоким разрешением, малым числом случайных пиков и хорошей воспроизводимостью.



## 4. Разработка приложений

4.1 Выявление лекарственной устойчивости бактерий

4.2 Методы кластеризации

4.3 Режим отрицательных ионов малых молекул

## 4.1 Выявление лекарственной устойчивости бактерий

### 1. Обнаружение характерных пиков бактерий, устойчивых к лекарственным препаратам

По сравнению с чувствительными штаммами в спектре бактерий, устойчивых к лекарственным препаратам, наблюдаются изменения в специфических пиках. Используя программное обеспечение для анализа спектров достаточного количества устойчивых штаммов, можно создать библиотеку, специально предназначенную для бактерий, устойчивых к лекарственным препаратам.

**Включет ESBL, AmpC, пенициллиназу, карбапенимазу и т.д.**

### 2. Сравнение пиков лекарственной устойчивости

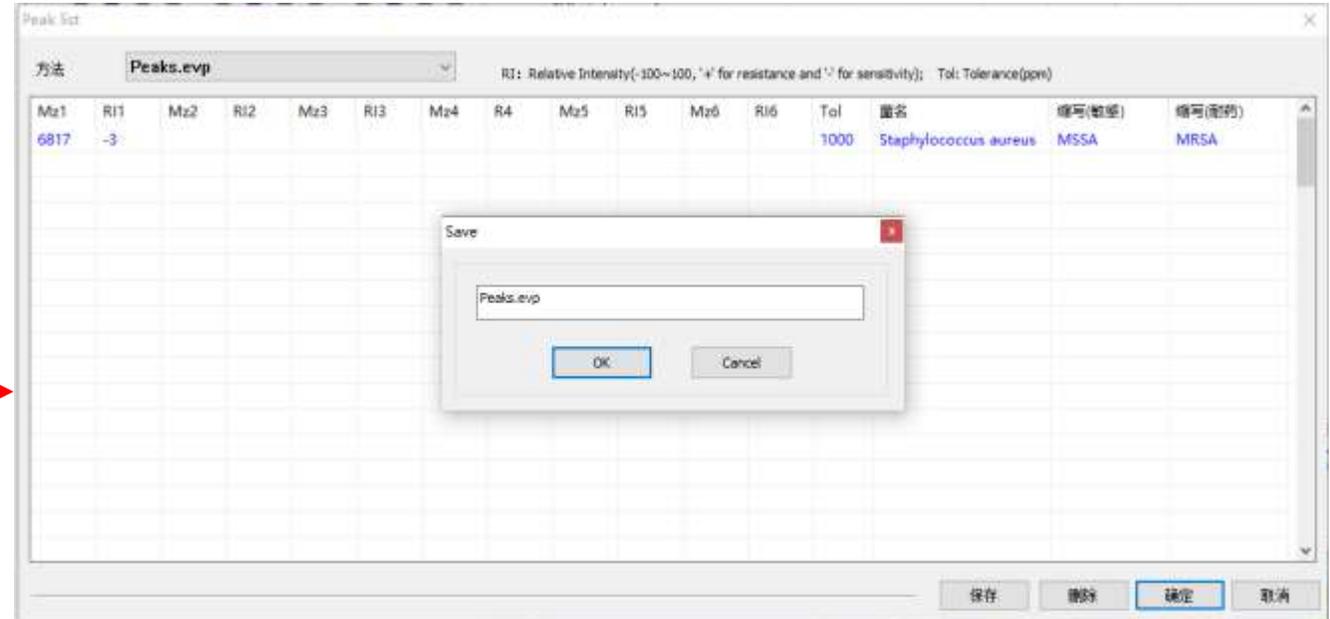
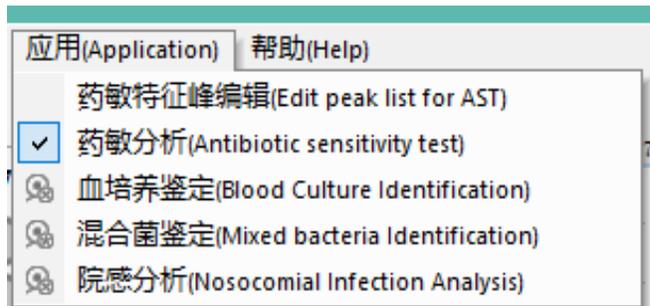
Механизм резистентности заключается в том, что устойчивые штаммы вырабатывают ферменты, способные гидролизовать соответствующие антибактериальные препараты. Антибактериальные препараты будут стабильно менять относительную молекулярную массу до и после гидролиза.

**Включает различные бактерии, разные гены, до тех пор, пока есть гидролаза**

# Определение лекарственной устойчивости по характерным пикам (Функция скрининга лекарственной чувствительности)

## Последовательность действий :

- 1) Отметьте галочкой “Тест на чувствительность к антибиотикам”
- 2) Введите информацию по характерным пикам



**Принцип:** после идентификации образца получите ещё раз спектр для быстрого скрининга лекарственной чувствительности по разнице в характерных пиках между устойчивым штаммом и чувствительным штаммом, (включает специфичные белковые пики; пики, меченные изотопами, различия в пиках гидролиза антибиотиков и т.д.).

Кроме того, программа может выполнять иные функции, такие как быстрый анализ больничных инфекций и типирование близкородственных бактерий.

# Определение лекарственной устойчивости по характерным пикам (Функция скрининга лекарственной чувствительности)

Peak list															
方法: Peaks.evp															
RI: Relative Intensity(-100~100, '+' for resistance and '-' for sensitivity); Tol: Tolerance(ppm)															
Mz1	RI1	Mz2	RI2	Mz3	RI3	Mz4	R4	Mz5	RI5	Mz6	RI6	Tol	菌名	缩写(敏感)	缩写(耐药)
6817	-3											1000	Staphylococcus aureus	MSSA	MRSA

## Шаги:

- ① Можно установить до 6 характерных пиков
- ② M/Z— отношение массы к заряду характерного пика
- ③ RI— Относительная интенсивность характерных пиков (максимум 100).  
Отрицательная RI (0-100) представляет собой характерные пики, появляющиеся у чувствительных штаммов. Положительная RI (0-100) – характерные пики, появляющиеся у устойчивых штаммов.

## Введение в алгоритмы анализа чувствительности к препаратам:

- ① Сначала ищем каждый характерный пик в соответствии со списком пиков и получаем относительную интенсивность (RI) каждого характерного пика в реальном спектре.
- ② Затем оцениваем каждый характерный пик. Те из них, которые относятся к чувствительным штаммам, получают отрицательные оценки, а пики устойчивых штаммов получают положительные оценки.
- ③ Наконец, результаты резистентности оцениваются на основе общего количества баллов (Интерпретация: отрицательные баллы указывают на чувствительность, положительные – на резистентность).

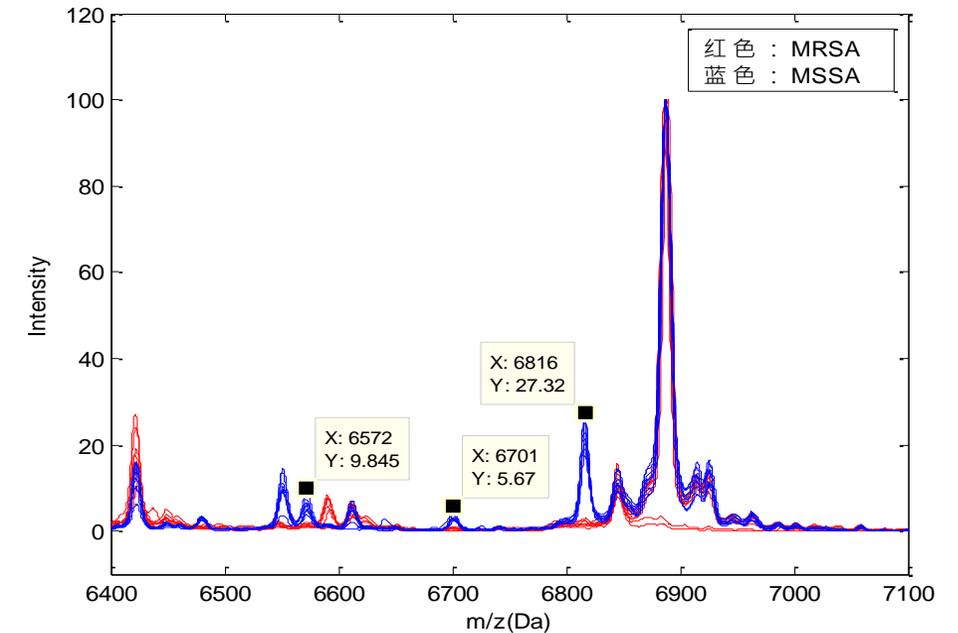
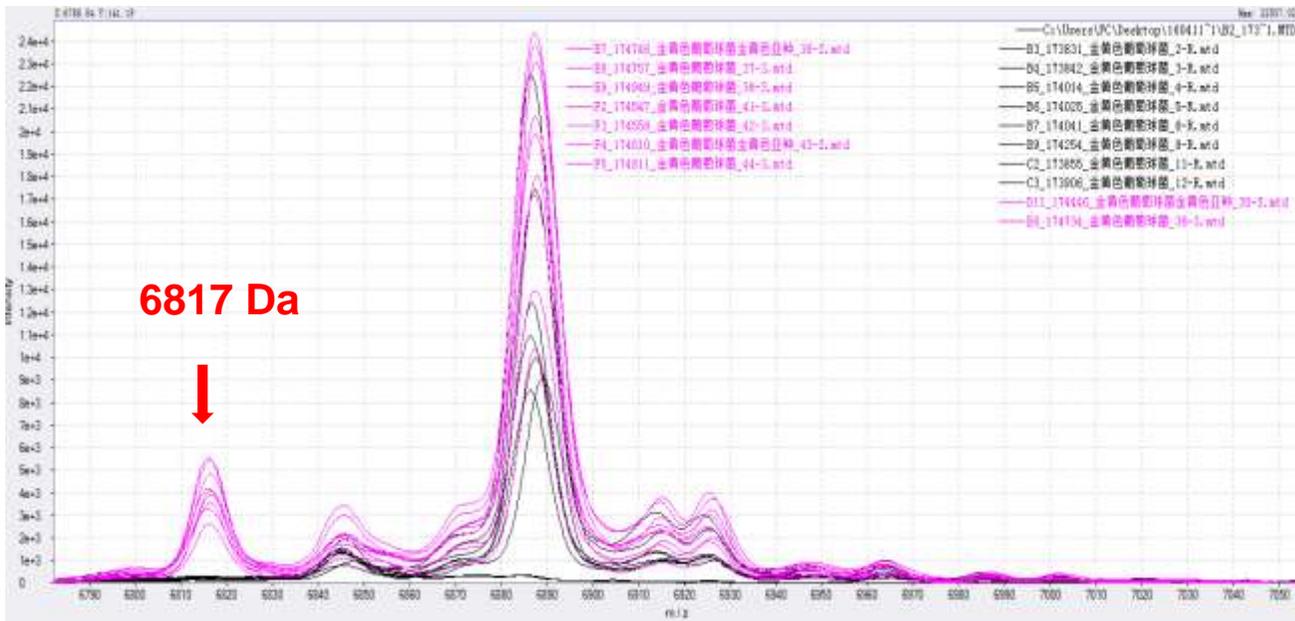
Аббревиатура устойчивых или чувствительных к препаратам штаммов (Если имеется несколько названий устойчивых штаммов, заполняют отдельные строки.)

Название штамма (В соответствии с базой данных)

Допуск для нахождения пика по соотношению массы к заряду (единица измерения: ppm)

# Определение лекарственной устойчивости по характерным пикам (Функция скрининга лекарственной чувствительности)

## Определение MSSA и MRSA

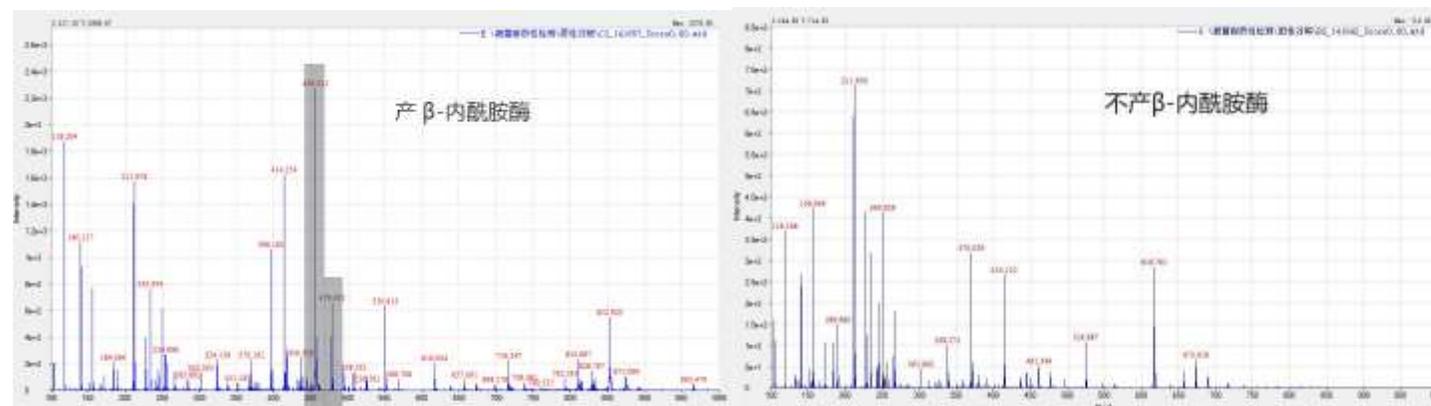
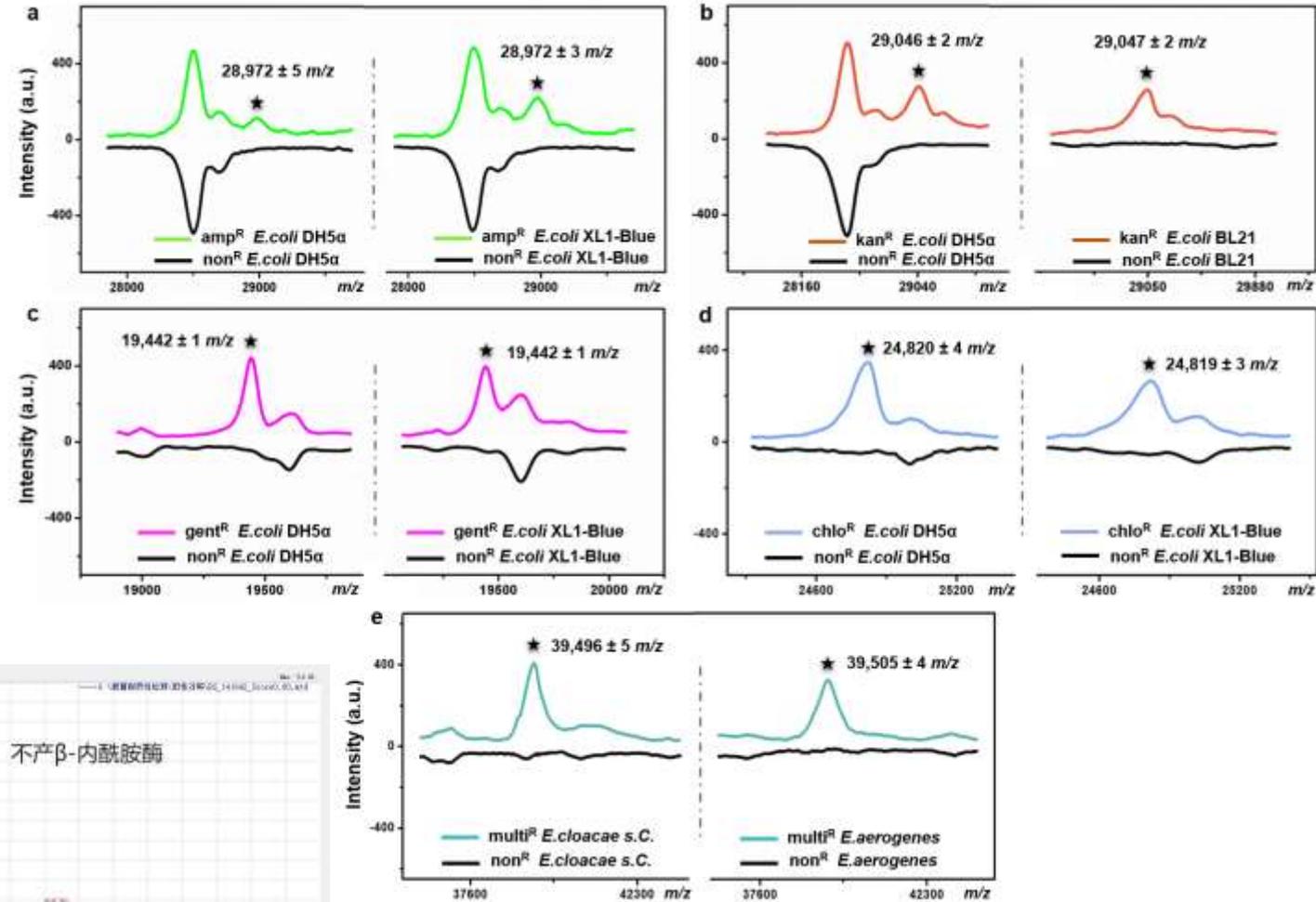


Значительные различия наблюдаются в выраженности некоторых характерных пиков в масс-спектрах MRSA и MSSA, таких как 6572 Da, 6701 Da и 6817 Da. После предварительной обработки 61 спектра был проведён иерархический кластерный анализ выделенных признаков. **Точность кластеризации составила 88.52%.**

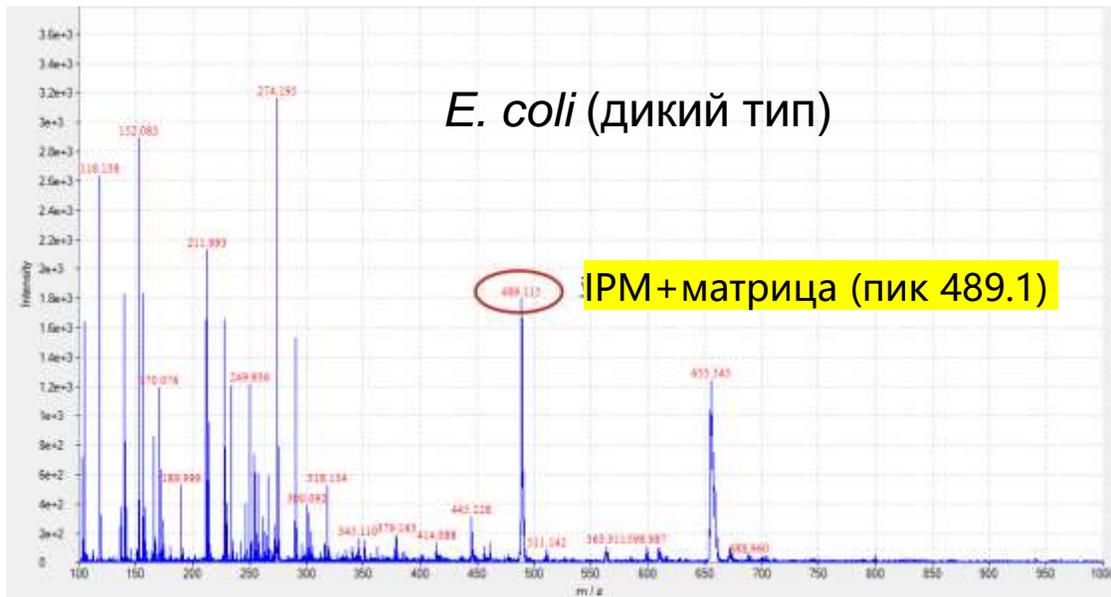
# Определение лекарственной устойчивости по характерным пикам

## Выявление бактерий, продуцирующих β-лактамазы

Анализируя различия в характерных пиках между бактериями, продуцирующими бета-лактамазы и бактериями, не продуцирующими эти ферменты, можно ввести характерные пики в систему для проведения скрининга и обнаружения лекарственной устойчивости одновременно с идентификацией.



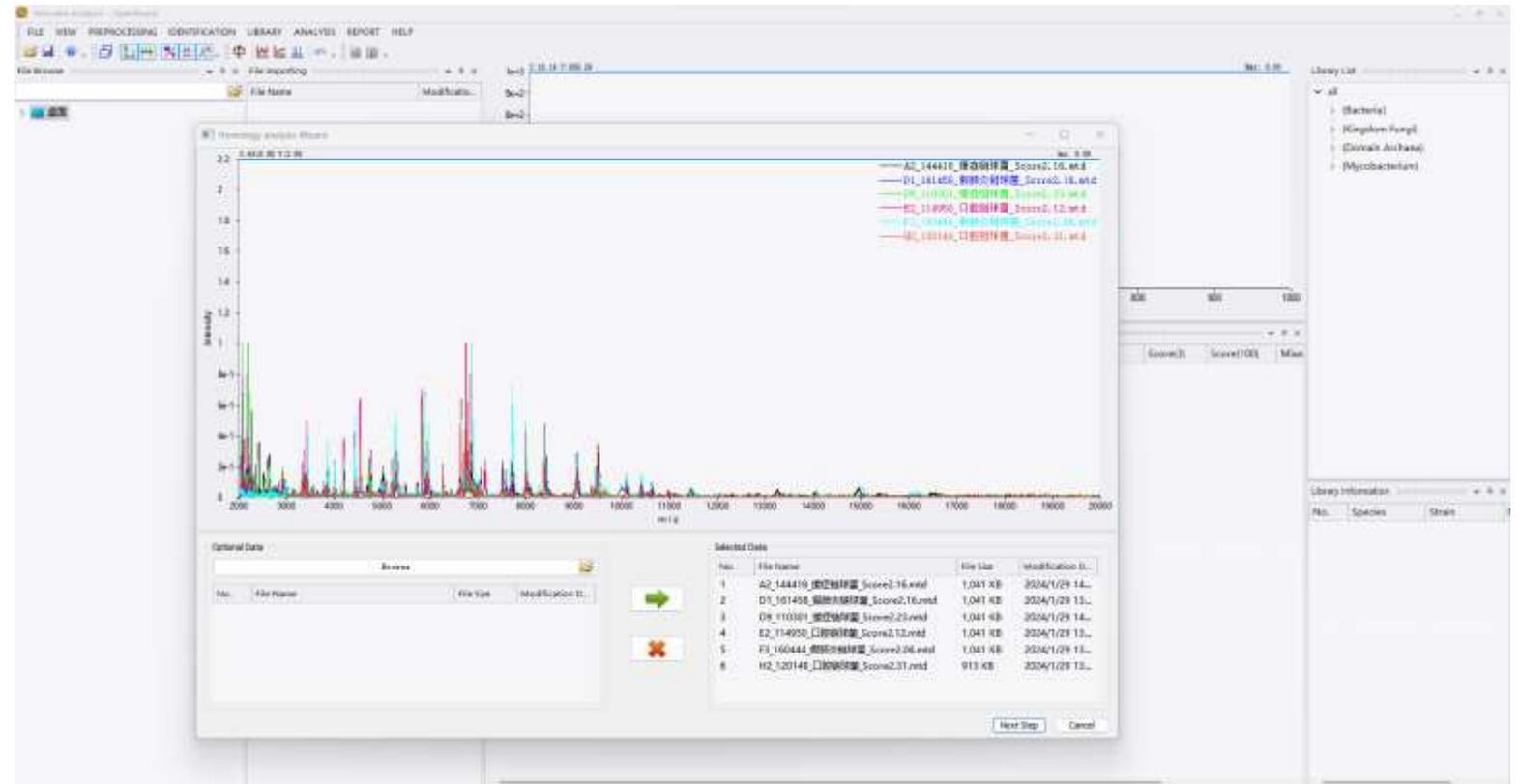
## Сравнение пика чувствительности к лекарственному препарату по гидролизу антибиотиков (кратковременная культура + режим малых молекул)



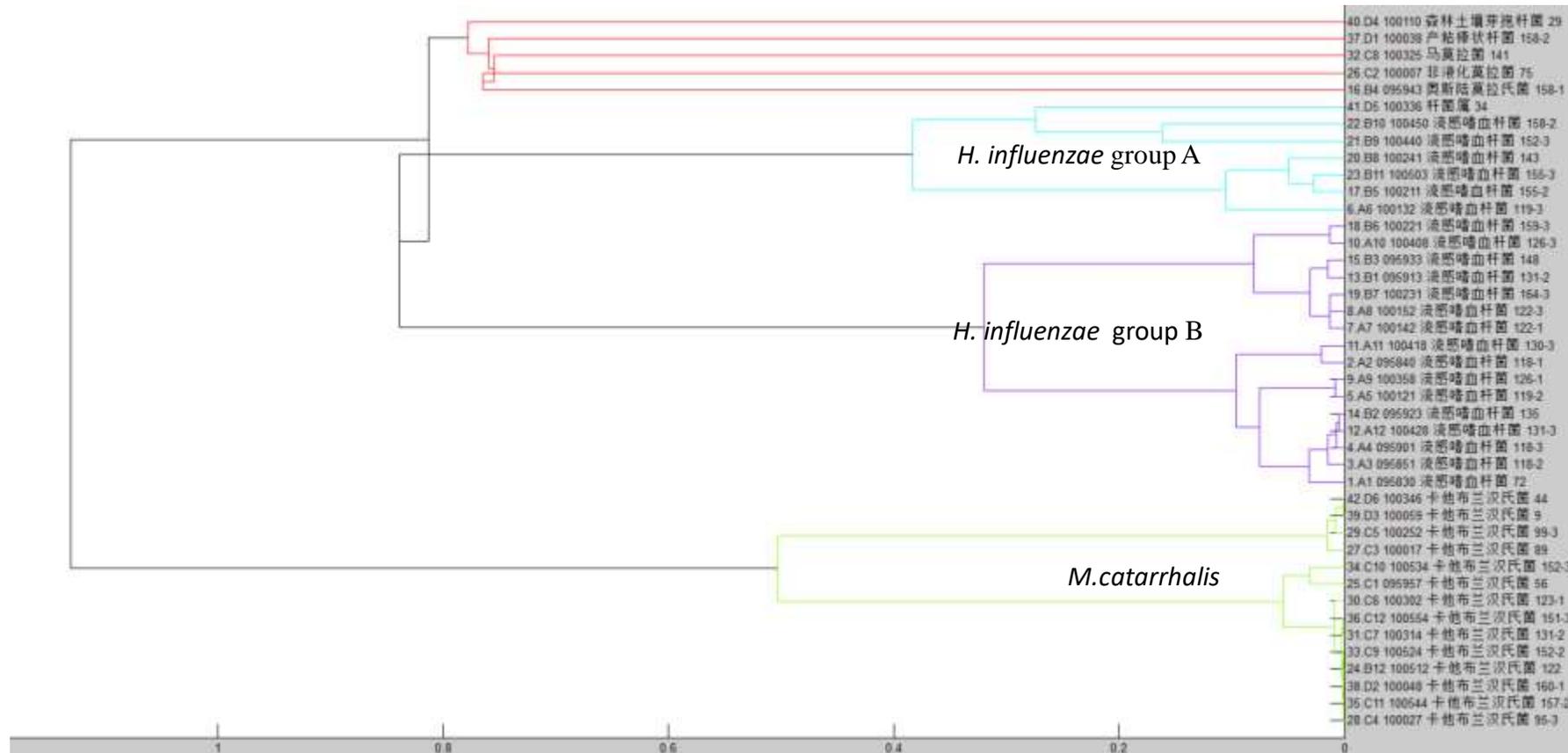
Смешайте один и тот же тип тестируемых бактерий (чувствительный штамм/устойчивый штамм, продуцирующий ферменты) с 10µl антибиотика и инкубируйте при 37°C в течение 2х часов. Возьмите супернатант и нанесите его на мишень с раствором матрицы. Проанализируйте в режиме малых молекул. Пик, характерный для фермента, продуцируемого устойчивым штаммом, исчезнет.

## 4.2 Методы кластерного анализа

MALDI-TOF MS позволяет сравнить белковые “отпечатки пальцев” штаммов. Кластерный анализ и типирование дают возможность определить соответствие сравниваемых штаммов, что имеет большое значение для расследования вспышек инфекционных заболеваний, для отслеживания источников, изучения и идентификации путей передачи и т.д.

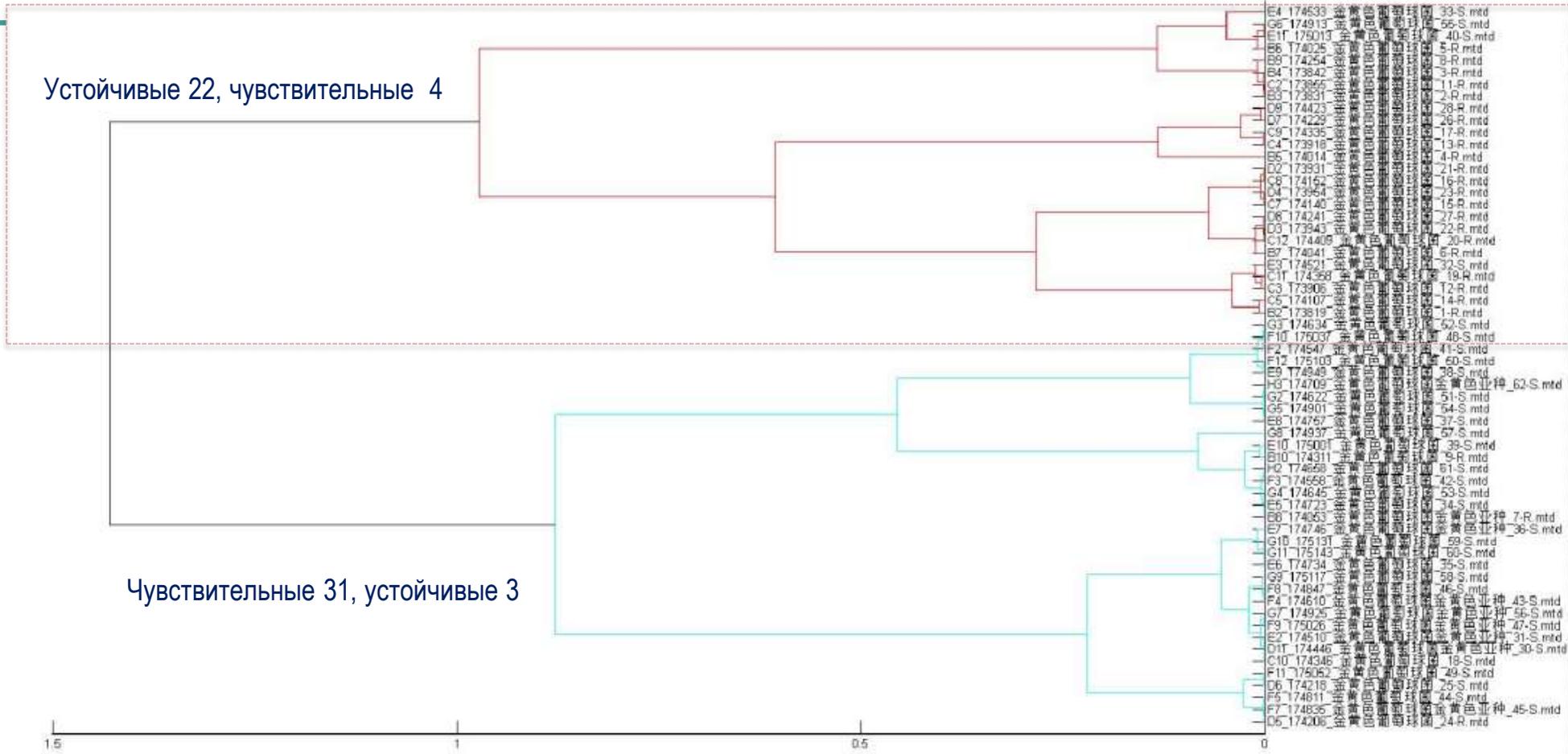


Функция кластерного анализа микроорганизмов



## Результаты кластерного анализа *H. influenzae* и *M. catarrhalis*

Сорок два хранившихся штамма бактерий, вызывающих инфекции дыхательных путей в определённом регионе, включая 22 штамма *H. influenzae*, 14 штаммов *Moraxella catarrhalis* и 6 штаммов других бактерий были подготовлены методом белковой экстракции и проанализированы с помощью функции кластерного анализа Microbe Analysis.



### Результаты кластерного анализа MRSA

Шестьдесят хранившихся клинических штаммов *Staphylococcus aureus*, 35 из которых были чувствительными к цефокситину (FOX-чувствительные), а 25 FOX-устойчивыми, проанализированы методом масс-спектрометрии при пробоподготовке белковой экстракцией и кластеризованы с помощью функции анализа Microbe Analysis.

## 4.3 Режим отрицательных ионов малых молекул

Определение липидов в режиме линейных отрицательных ионов

### 1. Отношение массы к заряду пика липида A ( $m/z$ )

Различие между бактериями, чувствительными к колистину, и бактериями, устойчивыми к колистину. Этот метод позволяет выявлять устойчивость к колистину у клинически полученных *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *Salmonella enteritidis*.

В настоящее время он добавлен в систему MALDI Biotyper Sirius.

### 2. Различия в содержании жирных кислот

Дифференциация между штаммами MRSA и MSSA. Исследование показало, что между ними существуют различия в составе жирных кислот. У MSSA выше содержание нечётных жирных кислот, а у MRSA – чётных.

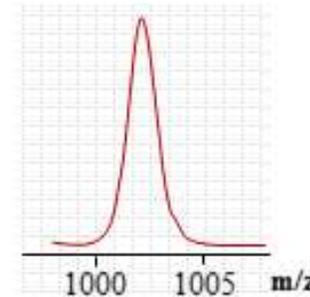
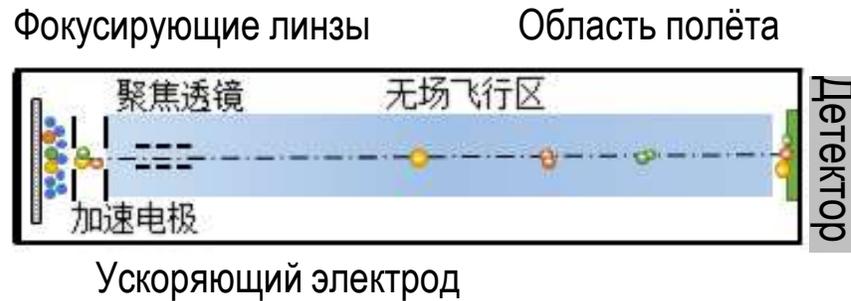
### 3. Изменения в содержании глицерофосфолипидов

Идентификация штаммов *E. coli*, подвергшихся воздействию сублетальных концентраций норфлоксацина, фторхинолонового антибиотика. У микобактерий вида *M. tuberculosis*, устойчивых к рифампицину, и у *E. faecalis*, устойчивого к даптомицину, наблюдаются изменения в содержании глицерофосфолипидов.

# Обнаружение липидов в режиме отражения отрицательных ионов



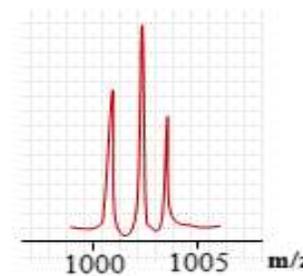
Линейный режим



- Разрешение масс: 1000-5000
- Точность: 100-200ppm
- Коэффициент вариации (CV) :20-30%



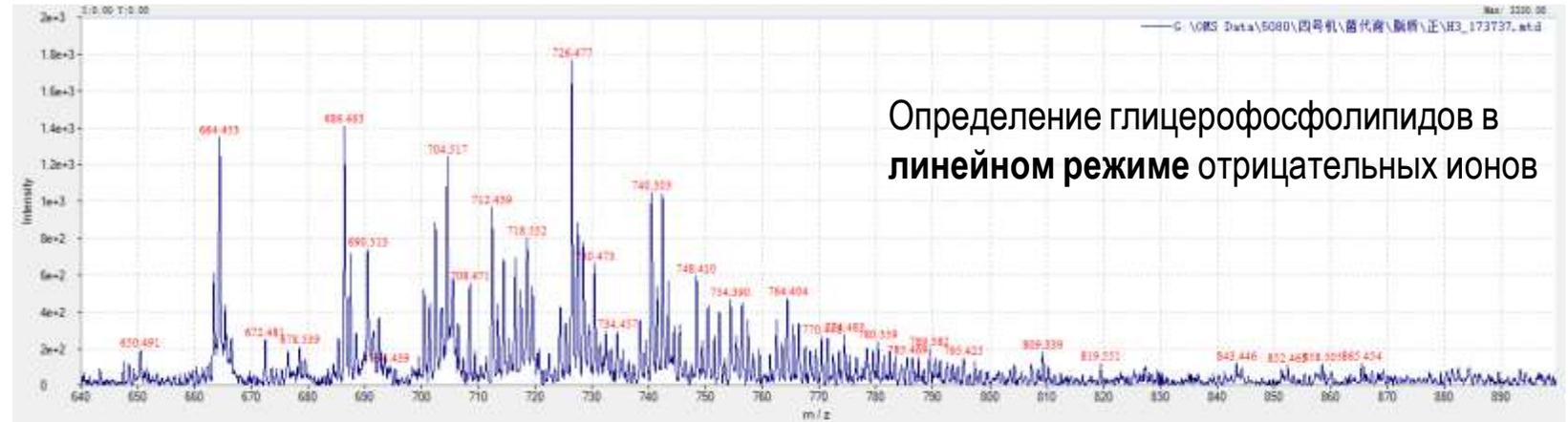
Режим отражения



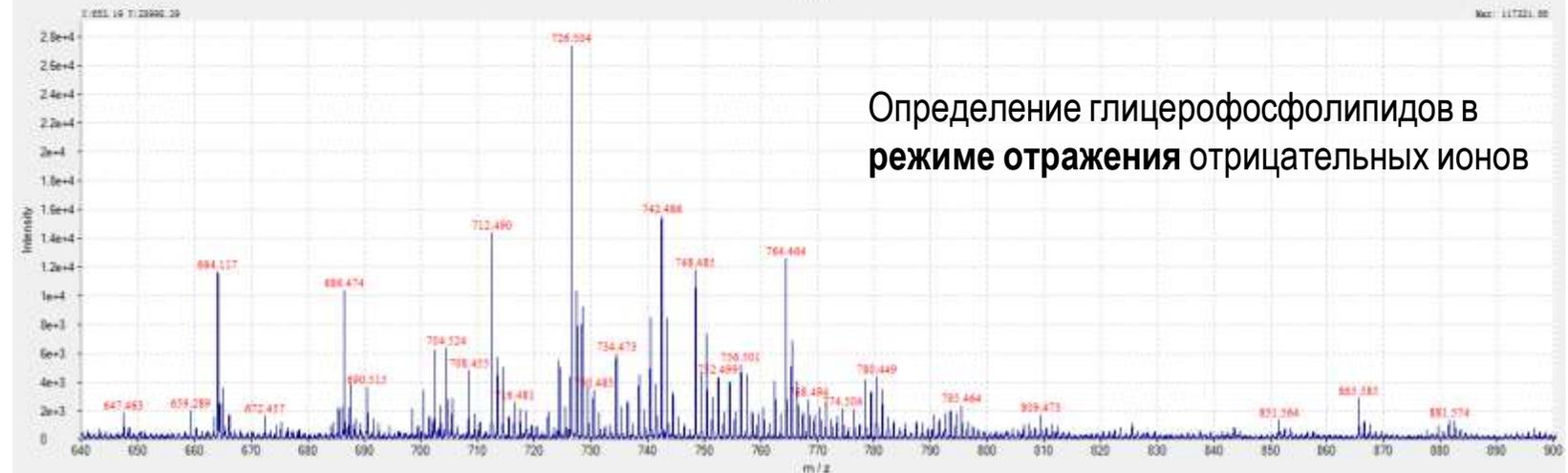
- Разрешение масс: 10000-20000
- Точность: 5-20ppm
- Коэффициент вариации (CV) :5-10%

## Например:

Высокое разрешение и высокая точность режима отражения позволяют количественно определять липиды, такие как глицерин и фосфолипиды, а также анализировать различия в соотношении содержания и создавать библиотеку липидов.



Определение глицерофосфолипидов в линейном режиме отрицательных ионов

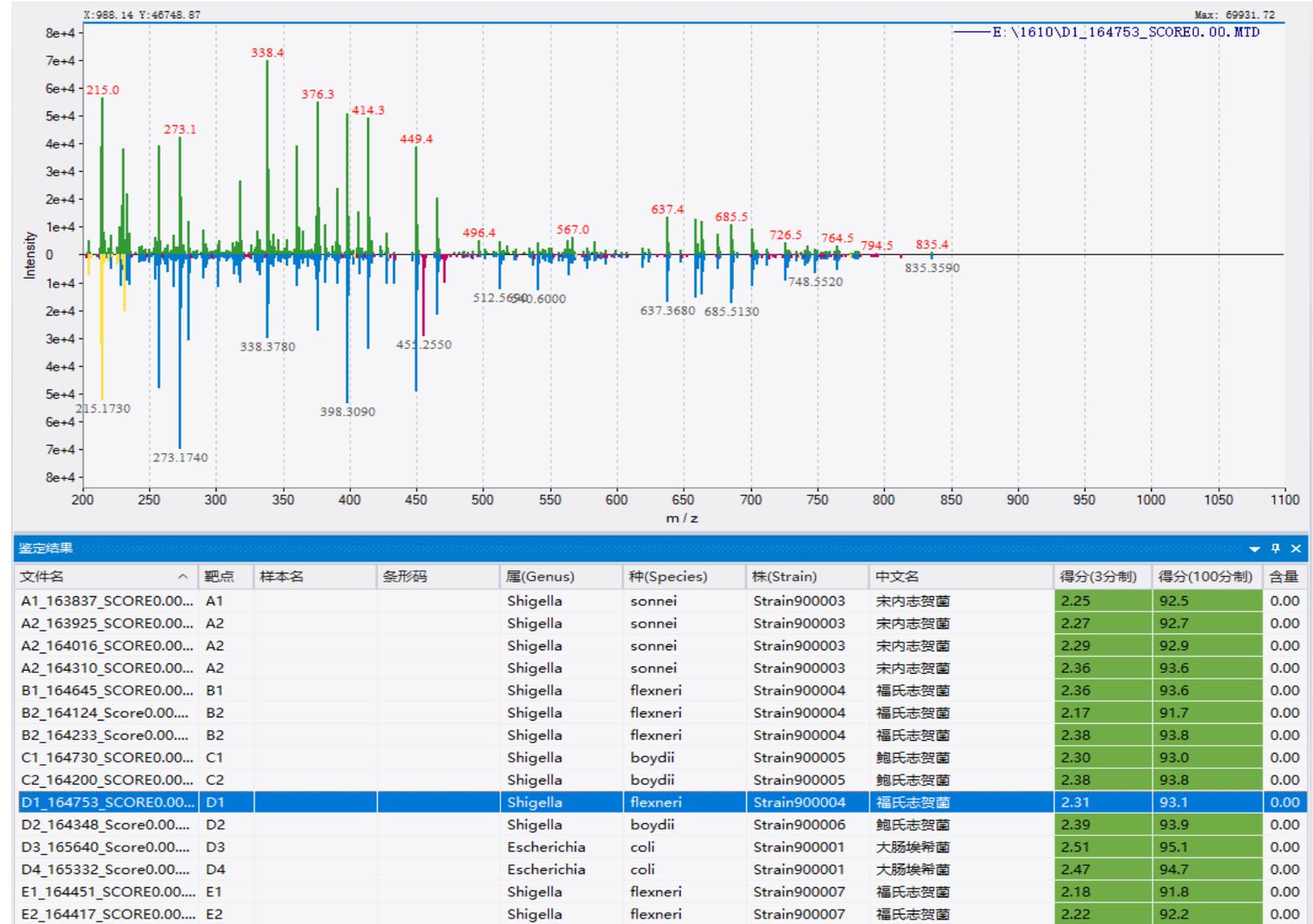


Определение глицерофосфолипидов в режиме отражения отрицательных ионов

# Анализ близкородственных микробов в режиме отрицательных ионов

Режим отрицательных ионов может быть использован для анализа липидов близкородственных микроорганизмов, чтобы решить проблему сложной идентификации неоднозначно идентифицируемых бактерий при масс-спектрометрическом анализе.

Распознавание *E. coli* и *Shigella*, а также классификация *Shigella* происходит со 100% точностью.



## Дальнейшая оптимизация базы данных



The background of the slide is an architectural rendering of a modern building complex at dusk. On the left, a tall, slender tower with a glass facade and a vertical garden strip is illuminated. In the center, a large, multi-story building with a glass and metal facade is visible, featuring a prominent entrance canopy with a glass roof. To the right, a long, low-rise building with a grid of windows is lit up. The sky is a deep blue, and the overall scene is lit with warm, artificial lights from the buildings and streetlights. The text is overlaid on the right side of the image.

**Благодаря тому, что MALDI-TOF MS становится рутинным тестированием, это способствует развитию данной технологии, приспособивая её для различных типов лабораторных приложений. В будущем, я полагаю, что организации, проводящие исследования и разработки, продолжат прилагать усилия для усовершенствования эффективности этого оборудования.**

***Спасибо за внимание!***

