

«Современные методы исследования в микробиологической практике на примере MALDI-TOF MS»

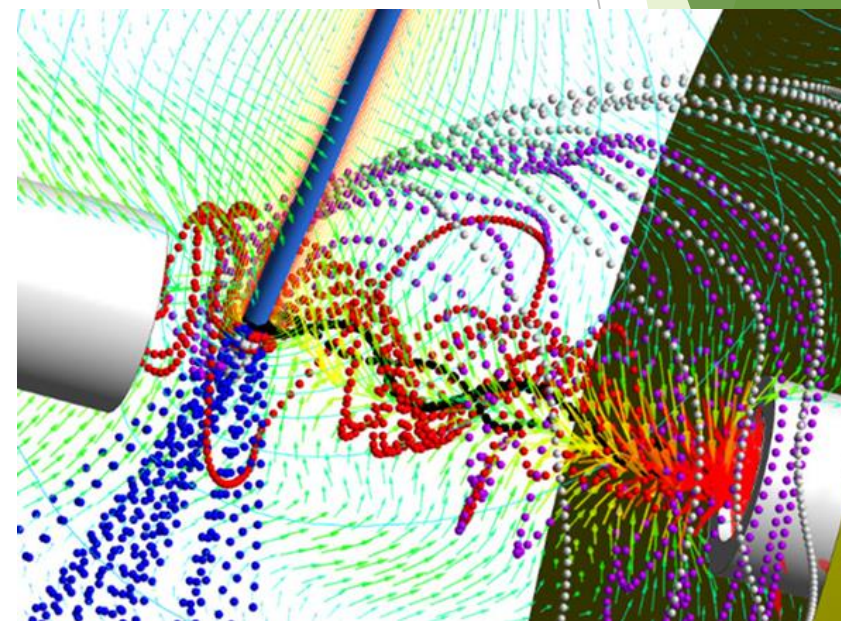
Отдел лабораторной медицины.

Врач-бактериолог Ахметова Дана Газизовна

2021 год

«Современные методы исследования в микробиологической практике на примере MALDI-TOF MS»

- ▶ Правильная идентификация микроорганизмов играет основную роль в диагностике инфекционных заболеваний, сепсиса, после манипуляционных инфекционных осложнениях и далее выявлении чувствительности к антибактериальным препаратам.
- ▶ Современные системы идентификации микроорганизмов можно разделить на **фенотипические** и **генотипические**.
- ▶ Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролётной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) является «фенотипической», устраняет пробел в достоверности результатов испытаний, полученных с помощью биохимических систем фенотипирования и идентификационных систем генотипирования. Это одна из самых последних систем идентификации микроорганизмов, доступных для лабораторий, очень быстра, что делает её хорошим примером «микробиологического экспресс-метода».

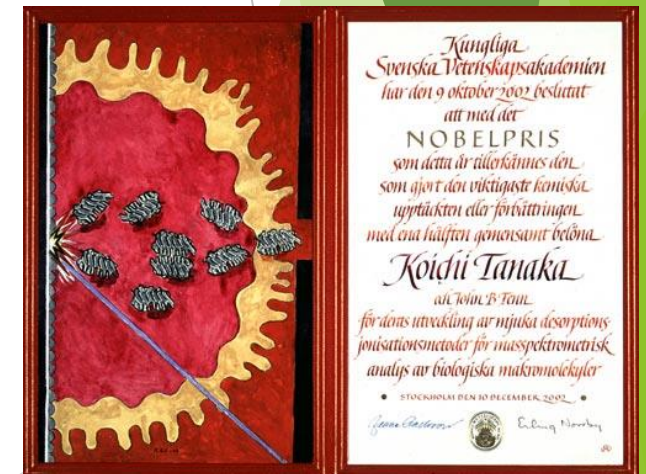
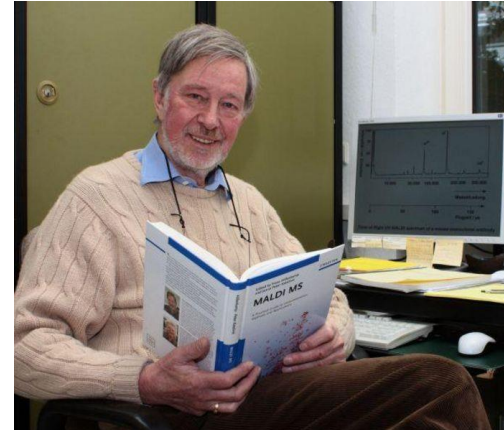


Из истории

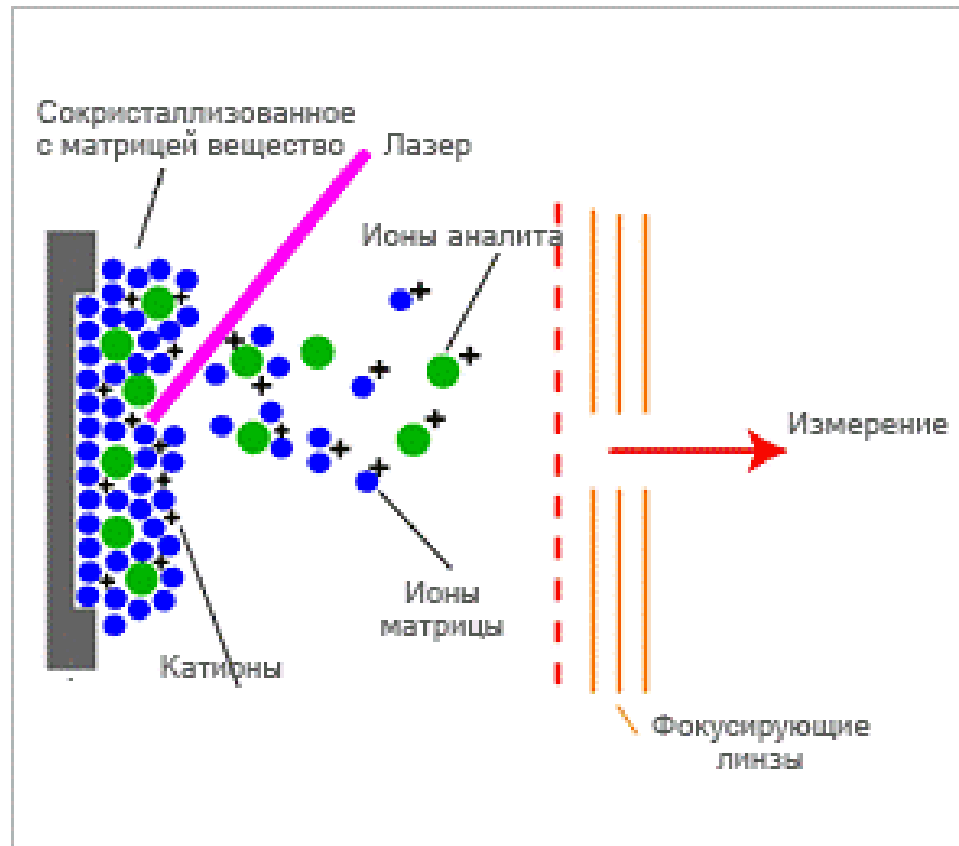
Основа метода MALDI-TOF берет свое начало из аналитической химии, а впервые этот метод был предложен Франц Хилленкампом/Franz Hillenkamp и Майкл Карасом/M Karas в 1988 году для анализа белков. В 1985 году Хилленкамп и его коллега Майкл Карас использовали масс-спектрометр LAMMA 1000, чтобы продемонстрировать технику матричная лазерная десорбция / ионизация (МАЛДИ).

Хотя Карас и Хилленкамп первыми открыли для себя МАЛДИ, японский инженер Коичи Танака был первым, кто использовал аналогичный метод в 1988 году для ионизации белков и получил за эту работу Нобелевскую премию по химии в 2002 году. Карас и Хилленкамп сообщили о МАЛДИ белков несколько месяцев спустя.

Метод MALDI Караса и Хилленкампа впоследствии стал гораздо более широко используемым методом.



Масс-спектрометрия



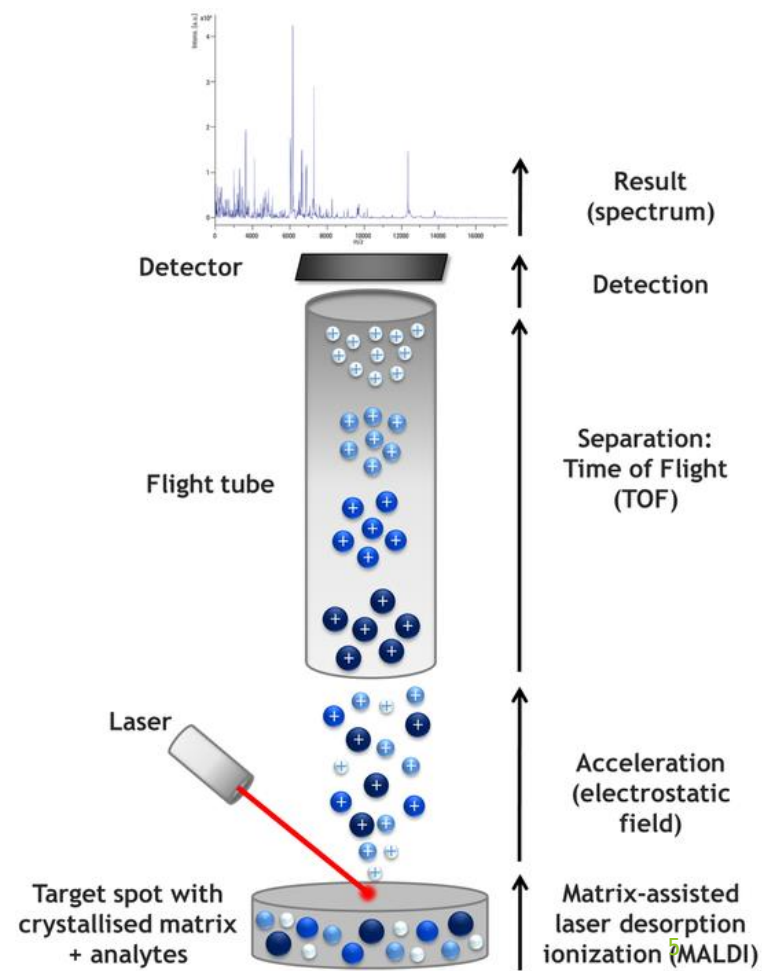
Масс-спектрометрия представляет собой метод химического анализа, который используют для измерения массы неизвестных молекул путем ионизации, разделения и обнаружения ионов в соответствии с их отношением массы к заряду (разделяя их на положительные и отрицательные ионы).

Данные регистрируют в виде масс-спектров.

MALDI-TOF

В основе MALDI-TOF лежит масс-спектрометрия. Масс-спектрометр состоит из трех основных компонентов:

- ▶ *-источника ионов* для ионизации и переноса ионов молекул образца в газовую фазу,
- ▶ *-масс-спектрометра* — устройства, разделяющего молекулы в зависимости от их массы и
- ▶ *-детектора* для мониторинга всех разделенных ионов.



Система VITEK MS

- ▶ Сравнительные исследования показали, что MALDI-TOF MS является сравнительно эффективным методом идентификации, поскольку это утверждение основывается на его воспроизводимости, скорости и чувствительности анализа.
- ▶ Одним из важных преимуществ MALDI-TOF MS по сравнению с другими методами идентификации является время получения результата.
- ▶ При использовании MALDI-TOF результаты, как правило, получают в течение нескольких минут, что обеспечивается относительно быстрым проведением испытания и подготовкой пробы, которая готовится также достаточно быстро и просто.



компания «bioMérieux» — прибор
«Vitek MS»

Система VITEK MS

- ▶ Одноразовые слайды с уникальным штрихкодом позволяют избежать внесения данных вручную, что ускоряет рабочие потоки на независимых рабочих станциях.
- ▶ Оптимизированная загрузка образцов: просто наносятся микроорганизмы на слайд, добавляется матрикс и запускается анализ.
- ▶ Готовые к использованию расходные материалы: готовые растворы матрикса, одноразовые слайды с универсальным штрихкодом
- ▶ Эффективность: до 4 слайдов с 48 позициями что позволяет идентифицировать 192 образца за одну загрузку.
- ▶ Уверенность: одноразовые слайды исключают риск контаминации и не требуют мытья.
- ▶ Возможность сканирования до 500 кДа (килодальтон).
- ▶ Обширная база данных - 1046 клинически значимых видов и более 15 172 штаммов.
- ▶ Возможность подключения расширенной базы данных для научных исследований (VITEK MS Plus).

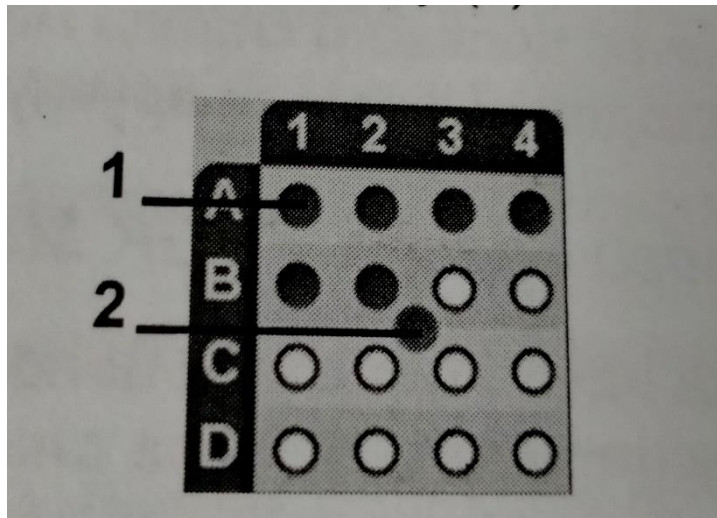
Система VITEK MS

Управление
подготовкой слайдов
для идентификации и
определения
чувствительности к
антимикробным
препаратам встроено в
VITEK® MS Prep Station



Система MS обеспечивает полную прослеживаемость и гибкость для повышения общей эффективности и надежности работы лабораторий.

- ▶ Слайды имеют три области захвата, каждая содержит 16 точек образцов (1) и каждая включает в себя одну калибровочную ячейку в центре группы захвата (2). Контроль за правильностью эксплуатации, настройки и регулировки полностью автоматизирован и прозрачен для пользователя.
- ▶ Лабораторный номер/номер изолята идентифицирует определенный образец. Каждый номер изолята включен в штриховой код пластины, поэтому будет автоматически заполнен при сканировании штрихового кода.
- ▶ Тип организма выбирается по умолчанию или вручную Бактерии или Грибы (дрожжевые, плесневые)



Калибровочный штамп:

ATCC E.coli 8739

Контроль качества
проводится при каждой
постановке

Положительный контроль:
Enterococcus faecalis ATCC
19433; Candida glabrata MYA -
2950

Отрицательный контроль:
матрикс VITEK MS-CHCA

1. Матрикс VITEK MS-CHCA-(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)

реагент для проведения ионизации



Матричный раствор готовый, устойчив к фоторазложению.

2. VITEK MS-FA (муравьиная кислота)

для предварительной обработки дрожжевых грибов



Транспортировка и хранение при +2° С
+8° С

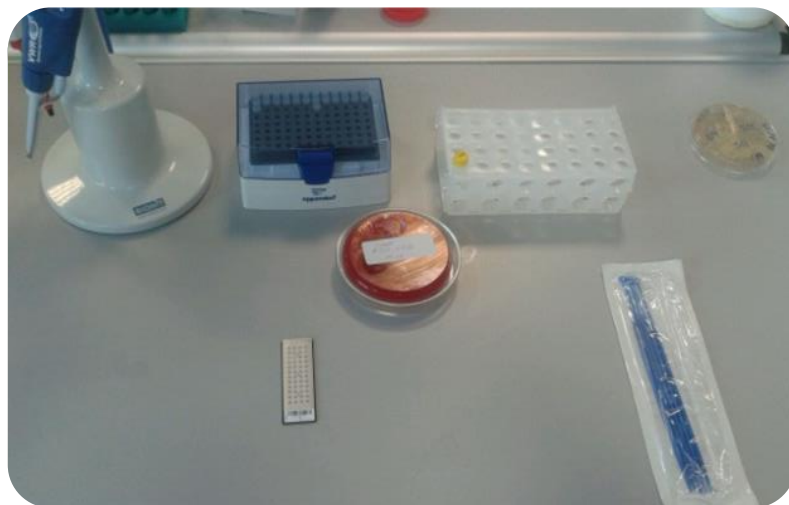
Этап подготовки образца

Для работы берется суточная культура, не более 24 часов.

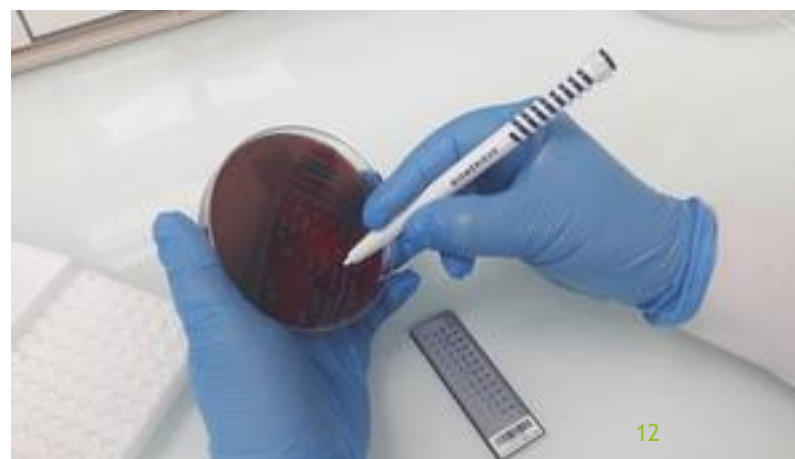
До момента испытания чашки с культурой не должны храниться при температуре $-2 - 8^{\circ}\text{C}$, поскольку холодильное хранение может повлиять на качество спектров.



Этап подготовки образца



Для анализа берется часть колонии и
круговыми движениями наносится на
слот



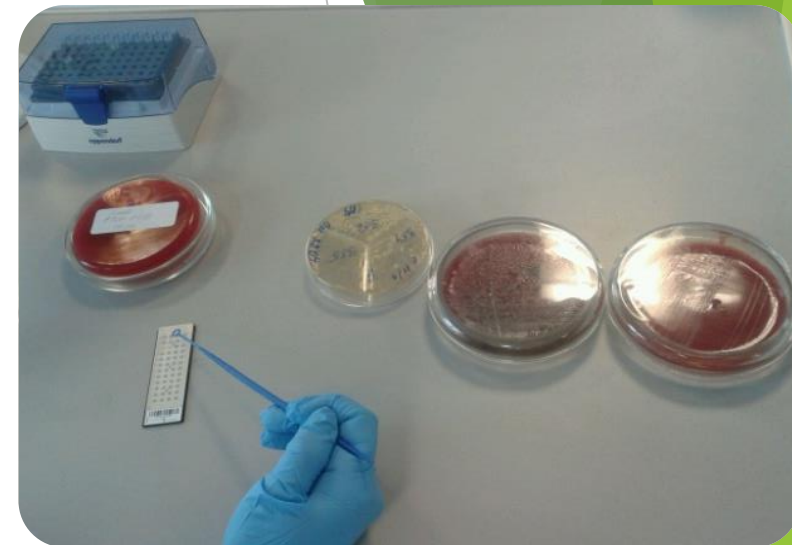
Этап подготовки слайда с образцами

Поверх пробы наносится матричный раствор в количестве 1 ml, смесь высушивается

Для контроля качества проводимого исследования в ячейки слайда вносятся *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 или *Candida glabrata* MYA -2950

Для отрицательного контроля вносится матрикс VITEK MS-CHCA

В центральную ячейку вносится калибровочный штамм ATCC 8739 *E.coli*



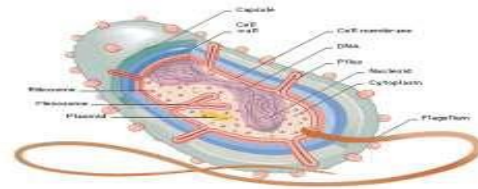
Ввод слайдов с нанесенными пробами в MS Vitek



- ▶ Слайды с образцами помещают в кассету и загружают в камеру с высоким вакуумом
- ▶ Точный лазерный импульс ионизирует образец
- ▶ Электрический заряд высвобождает и ускоряет «облако» белков
- ▶ После прохождения через кольцевой электрод регистрируют время пролета белков
- ▶ Белки определяют с помощью датчика для создания спектра, который представляет собой белковый макет каждого образца

Этап 2: Идентификация

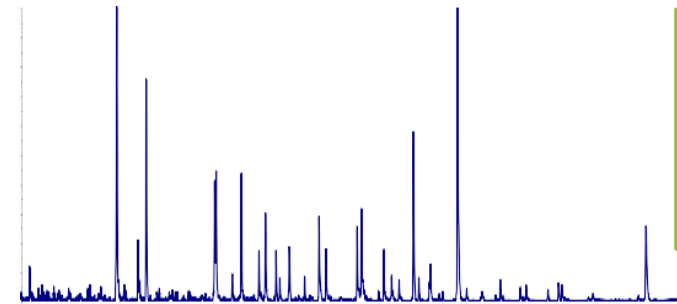
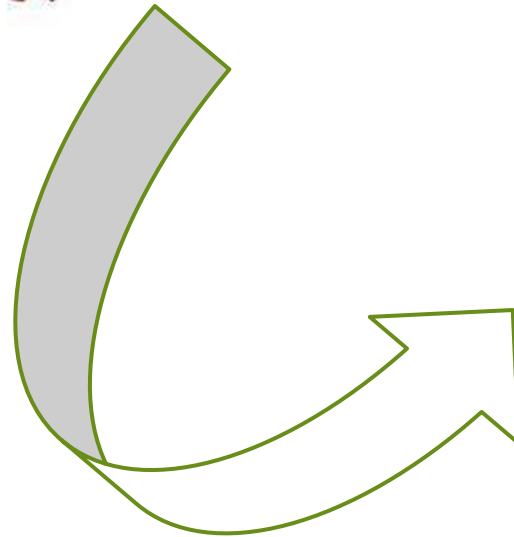
Белки



Бактериальная
клетка

Видовое
определение

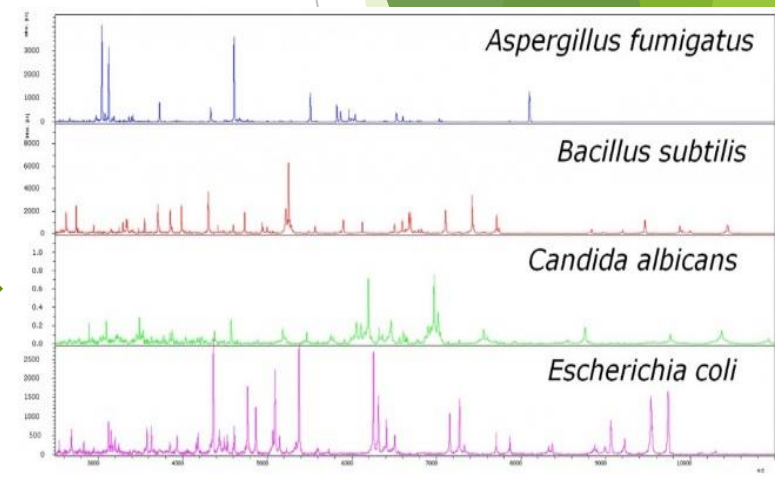
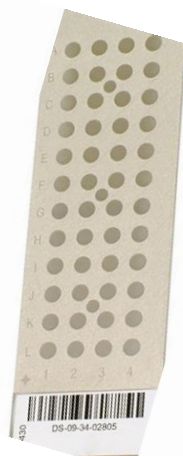
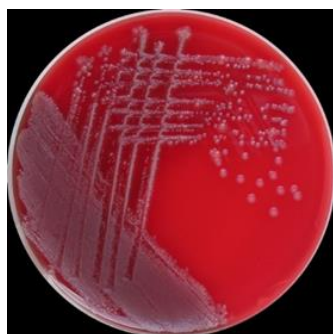
Протеом



Спектр-
отношение массы иона к его
заряду/ относительное количество
ионов данного вида
(интенсивность)

Схема этапов работы MS

Шаг 1 Культивирование
микроорганизма (не старше 24 часов)



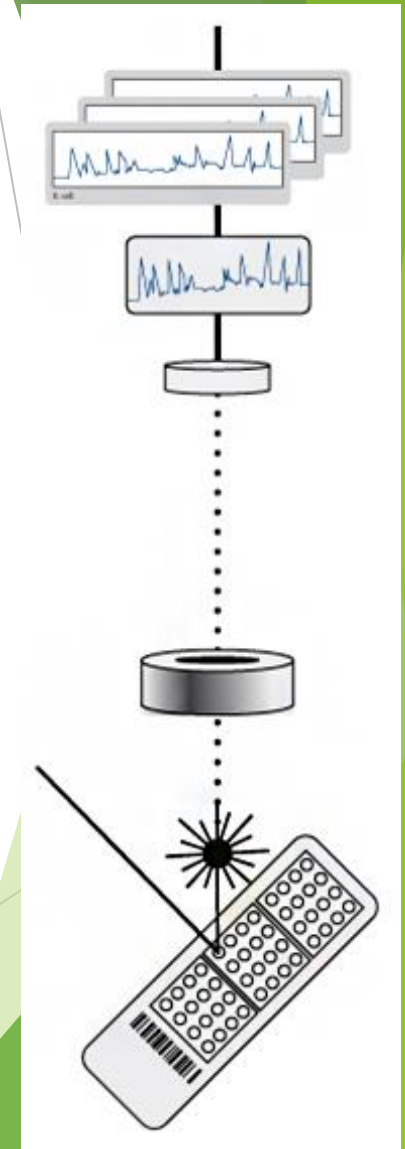
Шаг 2 Нанесение молекул на
слайд (1 слайд-48 образцов/
до 192 образцов

Шаг 3 Нанесение
матричного раствора на
образец. Просушивание:
1-2 мин.

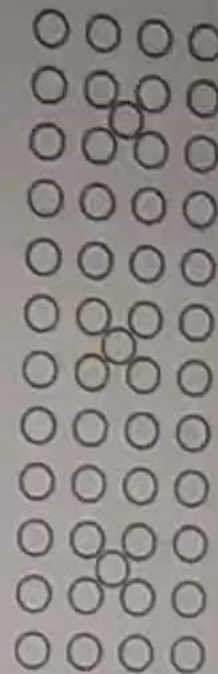
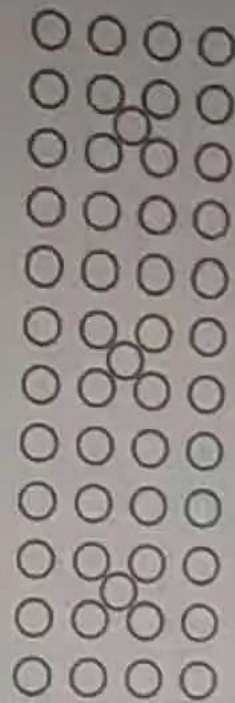
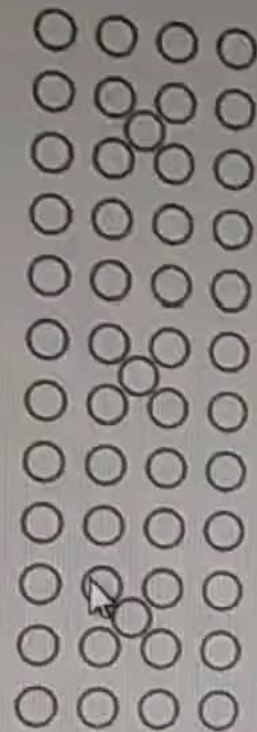
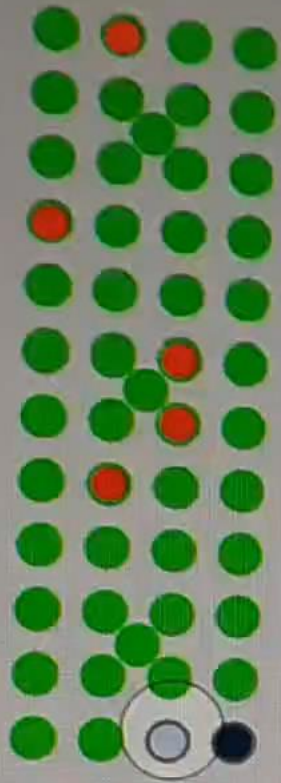
Шаг 4 Загрузка

Шаг 5 Формирование спектра. На 1
образец до 2 минут

Масс спектр

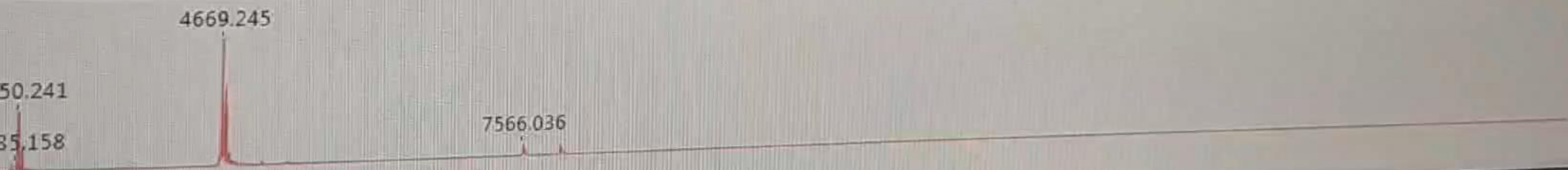


После ионизации, вызванной лазерным лучом, система выполняет сканирование на наличие микробных белков, которые в основном попадают в диапазон от 4000 до 20000 Дальтон (от 60 до 70 % от сухой



Option:
- Select "Stop" to stop the acquisition after the current acquisition group has been completed

: Profiles passed: 3



Легкая интерпретация результатов и визуализация с помощью MYLA



The screenshot shows the 'Обзор VITEK® MS' (VITEK MS Overview) window. It displays a table of test results for various bacterial strains. A green arrow points to the '99.9' value in the '99.9' column for the 'Staphylococcus aureus' strain.

№	Идентификация	Результат	Статус
1066-1	Staphylococcus aureus	99.9	Просмотренный
2740-1	Streptococcus pneumoniae	99.9	Просмотренный
2735-2	Neisseria meningitidis	99.9	Просмотренный
2755-2	Staphylococcus aureus	99.9	Просмотренный
2749-1	Candida albicans	99.9	Просмотренный
1062-1	Neisseria meningitidis	99.9	Просмотренный
2733-2	Streptococcus pneumoniae	99.9	Просмотренный
1361-2	Klebsiella pneumoniae	99.9	Просмотренный
1368-2	Acinetobacter baumannii complex	99.9	Просмотренный
2745-2	Moraxella nonliquefaciens	99.9	Просмотренный
2744-1	Staphylococcus aureus	99.9	Просмотренный
3357-3	Enterobacteriaceae	99.9	Загружен
3341-3	Staphylococcus aureus	99.9	Загружен

99,9%
достоверности
результатов

Спектр выделяемых патогенов

Система идентифицирует широкий спектр бактерий:

- ▶ Грамположительные кокки и палочки
- ▶ Ферментирующие и неферментирующие грамотрицательные палочки.
- ▶ Дрожжи
- ▶ Штаммы *Aspergillus*, *Fusarium* и *Penicillium* идентифицирует до видового уровня
- ▶ Анаэробные бактерии

Для проведения исследования достаточно одиночной колонии/части колонии (большие количества микробной культуры необходимы для дрожжей или мукоидных колоний)

Acinetobacter baumannii
Achromobacter xylosoxidans
Aspergillus flavus
Burkholderia cepacia complex
Burkholderia gladioli
Candida albicans
Candida glabrata
Candida lusitaniae
Candida dubliniensis
Candida parapsilosis
Candida krusei
Candida tropicalis
Stenotrophomonas maltophilia
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae
Ralstonia mannitolilytica
Ralstonia pickettii
Rothia mucilaginosa
Chryseobacterium
indologenes
Corynebacterium striatum
Chryseobacterium gleum

Спектр сложно идентифицируемых бактерий

Haemophilus influenzae (грамотрицательные - неподвижные коккобациллы семейства *Pasteurellaceae*, патоген при пневмонии, бактериемии, менингитах, эндокардитах...)

Elisabethkingia meningoseptica (грам- палочка, чаще изолируется у больных с муковисцидозом. Открыта в 1959 году американским бактериологом Элизабет О.Кинг, изучавшая детские менингиты и сепсисы)

Peptostreptococcus anaerobius (грам + анаэроб, сферической формы, парами короткими цепочками, обитает в полости рта и кишечнике; патоген при онкологии, раны, бактериемия)

Aeromonas hydrophila (грам – палочки, коккобациллы, живет в аэробных и анаэробных условиях-патоген кровотока, ран, кишечника)

Granulicatella adiacens (грам + стрептококк- бактериемия, инфекционный эндокардит, м.б патогеном при гастроэнтеритах, ранах, бактериемии)

Ochrobactrum anthropi (аэробные грам – палочки
Семейство:
Brucellaceae, новый патоген кровотока, у пациентов с постоянными катетерами, чувствительный к фторхинолонам и карбапенемам, устойчивый к пенициллинам и цефалоспорином)

Преимущества использования системы MALDI-TOF MS

- ▶ Автоматизация методов идентификации микроорганизмов, тем самым уменьшается длительность ручных операций для решения более важных задач
- ▶ Увеличение скорости исследования. Высокая мощность для крупных лабораторий (192 образца за рабочий цикл) и небольшие секции (16) для мелких и средних лабораторий
- ▶ Стандартизация микробиологических исследований
- ▶ Повышение качества проводимых исследований
- ▶ Расширение спектра выделяемых патогенов
- ▶ Сокращение времени на проведение идентификации и сокращение срока выдачи результата
 - ✓ эффективное лечение пациента
 - ✓ снижение смертности
 - ✓ существенное сокращение сроков госпитализации
 - ✓ экономия бюджетных средств.

Спасибо за внимание!