

Метод идентификации нетуберкулезных микобактерий с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

Богуш¹ Л.С., Дюсьмикеева¹ М.И., Цыбрук² Т.В., Слизень¹ В.В., Романейко¹ А.Ю., Давидовская¹ Е.И.

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии»

²ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»

Актуальность. Видовая идентификация культур нетуберкулезных микобактерий (НТМ) является первым обязательным шагом в диагностике микобактериозов и формировании схемы химиотерапии. В настоящее время в нашей стране с этой целью используют бактериологические и молекулярно-генетические (комерческие) GenoType Mycobacterium CM (Hain Lifescience, Германия) методы идентификации НТМ. Данные методы обладают целым рядом ограничений в применении: недостаточная специфичность у первого метода, ограниченная возможность для идентификации по виду (у обоих методов), зависимость от импорта у второго метода [Суркова Л.К., 2020].

Метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) произвел революцию в микробиологической идентификации благодаря своей скорости, точности и низкой стоимости одного анализа [Казюлина А.А., 2024]. Принцип данного метода заключается в анализе уникальных "протеомных отпечатков пальцев" микроорганизмов. Идентификация вида НТМ методом MALDI-TOF до сих пор была затруднена из-за высокого содержания липидов в клеточной стенке микобактерий, сложностью их лизирования и экстракцией белков малой массы. До сих пор технология экстракции белков, применяемая для идентификации других микроорганизмов, не позволяла получить результат хорошего качества у НТМ.

Цель исследования: отработать метод экстракции белков малой массы, оценить чувствительность MALDI-TOF для идентификации вида НТМ.

Материалы и методы: 25 чистых культур НТМ; полированная стальная мишень с 96 лунками (MSP Polished Target Steel, 96) и Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics, Германия); программа FlexControl 3.4 (Bruker Daltonics GmbH, Германия); спектрометр MALDI-TOF Microflex LRF; программа FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Германия); программное обеспечение MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics GmbH, Германия); коэффициент точности идедентификации для НТМ методом MALDI-TOF -1,6; GenoType Mycobacterium CM (VER 2.0).

Результаты: изучена эффективность экстракции белковой фракции НТМ с помощью 7 различных протоколов, что связано со структурными особенностями микобактерий и сложностью выделения белков из них (таблица 1).

Характеристика результатов идентификации НТМ методом MALDI-TOF в сопоставлении с данными идентификации GenoType Mycobacterium CM (VER 2.0) и уровнем коэффициента точности представлена в таблице 2 (фрагмент).

Таблица 1 - Характеристика этапов семи использованных протоколов экстракции белков НТМ для их идентификации с помощью MALDI-TOF

Этапы метода	Последовательность действий						
	1	2	3	4	5	6	7
Нагревание в этаноле (70%) при 95 °С – 25 мин	1				1		
Нагревание в воде при 95 °С – 25 мин		1	1	1		1	1
Внесение кварцевого песка (50 мкл), вортексирование				2	4		
Внесение ПАВ** (в данных исследованиях)							2
Внесение спирта 70%				3*	2	2*	3*
Внесение ацетона 1:4	2			3*		2*	3*
Центрифугирование, удаление супернатанта		2		4		3	
Внесение ТФУ (50 мкл), вортексирование, внесение воды (150 мкл)		3					
Внесение растворителя				5		4	
Отмывка***	3			6	3	5	4
Ультразвуковая обработка 20 минут при t= 80 °С	4		2	7	5	6	
Внесение ацетонитрила и муравьиной кислоты ****	5	4	3	8	6	7	5

* – внесение в пробу двух реагентов перед проведением следующей стадии; ** – после внесения ПАВ проводят трехкратное вортексирование с интервалом 10 с; *** – трехкратная отмывка: центрифугирование, удаление супернатанта, восстановление объема водой Milli-Q. После отмывки ресуспендирование осадка в 50-100 мкл воды Milli-Q; **** – внесение каждого реагента в объеме, равном пробе (тут скорее внесение каждого реагента в равном объеме, то есть я добавляла равные количества ацетонитрила и муравьиной кислоты в зависимости от количества осадка, но нельзя сказать, что эти объемы были равны объему осадка).

Таблица 2 - Фрагмент "Результаты идентификации НТМ с использованием разных протоколов"

Изолят	Вид с помощью GenoType Mycobacterium CM	Результаты MALDI		Совпадение
		Вид	Коэф. точн	
61	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	1.885	да
		423_D_II_2007_BSI	1.178	
		<i>M. chelonae</i> E_07_2006_BSI		
2964	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. fortuitum</i> BlutK LSM	1.764*	нет
		<i>M. fortuitum</i> E_09_2007_BSI	1.472	
10310	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> BlutK LSM	2.0*	да
14952	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> E_09_2006_BSI	2.025*	да
5386	<i>M. abscessus</i>	<i>M. chelonae</i> E_07_2006_BSI	<u>1.245</u>	нет
		<i>M. xenopi</i> 02 TWF	1.029	
		<i>M. marinum</i> E_07_2007_BSI	1.086	
		<i>M. malmoense</i>		
11530	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> 1476_BSI	1.771	да
			1.131	

Выводы: чувствительность метода MALDI-TOF для идентификации НТМ (с учетом отсутствия в базе данных спектра MALDI-TOF *M. intracellulare*) составила 76% ; установлена необходимость выделения чистых культур НТМ из образцов первичного роста на селективных средах – Левенштейна-Йенсена и др.; работа со смесью (нечистой культурой) приводит к низким уровням коэффициента и ошибкам идентификации.