

Перевод. Оригинальная статья: El Khe´chine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M (2011) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Identification of Mycobacteria in Routine Clinical Practice. PLoS ONE 6(9): e24720. doi:10.1371/journal.pone.0024720

Идентификация микобактерий в рутинной клинической практике методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-ТОФ МС)

Amel El Khe´chine, Carine Couderc, Christophe Flaudrops, Didier Raoult, Michel Drancourt*

URMITE UMR CNRS 6236 IRD198, Institut Hospitalier Universitaire POLMIT, IFR48, Universite´ de la Me´diterrane´e et Poˆle de Maladies Infectieuses, Assistance Publique-Hoˆpitaux de Marseille, Marseille, France

Абстракт

Базовая информация: Нетуберкулезные микобактерии, выделяемые из образцов дыхательных путей, затрудняют лабораторную диагностику туберкулеза во всем мире. Существует настоятельная необходимость в новых методах быстрой идентификации микобактерий в клинической практике. Ранее было доказано, что времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-ТОФ МС) эффективно идентифицирует микобактерии, выращенные в высококонцентрированных инокулятах из коллекций. Однако тщательная оценка ее использования в обычной лабораторной практике не проводилась.

Методология: Мы создали оригинальный протокол для идентификации МАЛДИ-ТОФ МС термоинактивированных микобактерий после диссоциации в Твин-20, механического разрушения клеточной стенки и экстракции белка муравьиной кислотой и ацетонитрилом. Применяя этот протокол к всего лишь 10^5 колониеобразующих единиц эталонных изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* и 20 других видов *Mycobacterium*, мы получили видоспецифичные масс-спектры для создания локальной базы данных. Используя эту базу данных, наш протокол позволил идентифицировать с помощью МАЛДИ-ТОФ МС 87 клинических изолятов *M. tuberculosis*, 25 клинических изолятов *M. avium* и 12 нетуберкулезных клинических изолятов с числовыми значениями достоверности идентификации ≥ 2 в течение 2,5 часов.

Заключение: Наши данные показывают, что МАЛДИ-ТОФ МС можно использовать в качестве метода первой линии для рутинной идентификации термоинактивированных микобактерий. МАЛДИ-ТОФ МС является привлекательным методом для применения в клинических микробиологических лабораториях как в развитых, так и в развивающихся странах.

Введение

Легочный туберкулез - смертельная контагиозная инфекция, вызываемая микобактериями, входящими в комплекс *Mycobacterium tuberculosis* (МБТК) [1]. Туберкулез по-прежнему входит в первую десятку приоритетов в области здравоохранения во многих развивающихся странах и, учитывая ежегодную регистрацию в таких странах более 1,3 миллиона новых случаев заболевания [2], а также появление и быстрое распространение в них штаммов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью и широкой лекарственной устойчивостью, быстрая лабораторная диагностика туберкулеза является очень важной. Однако эта задача осложняется появлением нетуберкулезных микобактерий, присутствующих в образцах дыхательных путей у пациентов, подозреваемых в туберкулезе легких, даже в странах с высокой заболеваемостью туберкулезом легких и высокой тяжестью его протекания [3]. Например, недавнее исследование показало, что 52,5% нетуберкулезных изолятов на Тайване были из образцов дыхательных путей [4]. Действительно, род актинобактерий *Mycobacterium* состоит из более 120 видов, включая как облигатные человеческие патогены, такие как возбудитель проказы *Mycobacterium leprae* [5] и представители МБТК, так и оппортунистические патогены, такие как микобактерии комплекса *Mycobacterium avium* и группы *Mycobacterium abscessus*, и безвредные организмы окружающей среды [6]. Идентификация микобактерий долгое время была основана на обычных фенотипических методах, требующих длительного времени инкубации и задерживающих постановку окончательного диагноза гораздо дольше, чем это указано в медицинских рекомендациях [3]. В некоторых развивающихся странах эти методы были успешно заменены прямым микроскопическим обнаружением тяжей, специфичных для *M. tuberculosis*, после 5-10-дневной инкубации образца либо в агаре, либо в миниатюризированной жидкой среде [7,8]. Однако, эти методы требуют определенного опыта персонала и полагаются на микроскопическое исследование - зависящий от оператора метод, который подвержен ошибкам. В то время как некоторые другие методы фенотипического анализа микобактерий, такие как жидкостная хроматография высокого давления миколовых кислот клеточной стенки, оказались эффективными при

идентификации, они не были внедрены в качестве обычной методики в клинических лабораториях микробиологии [9,10]. Молекулярные методы, включая методы гибридизации на основе ПЦР и секвенирования [11,12], в настоящее время обычно используются для идентификации микобактерий в лабораториях развитых стран. Недавно было показано, что ПЦР в реальном времени эффективна для быстрого выявления туберкулеза, в том числе туберкулеза, резистентного к рифампицину, в образцах из респираторных путей [13,14]. Эти молекулярные методы по-прежнему требуют специфического опыта оператора и технически сложного дорогостоящего оборудования [15-17]. В нескольких исследованиях было доказано, что с помощью МАЛДИ-ТОФ МС также можно идентифицировать микобактерии [18-21]. В самом деле, этот метод появился в последние годы как революционное средство для рутинной идентификации бактериальных изолятов [22-32]. Показано, что МАЛДИ-ТОФ МС дает точные результаты в течение нескольких часов по более низкой цене, чем любой другой метод, обычно используемый в клинических микробиологических лабораториях [32]. Однако в исследованиях, развивающих этот метод, анализировали инокулят с высокой концентрацией [18-21]. В нескольких исследованиях микобактерии анализировали без предварительной инактивации [21,33], что не соответствует действующим стандартам работы с опасными организмами. Поэтому мы стремились к дальнейшему изучению различных протоколов инактивации и использования растворителей, которые можно было бы рассмотреть для микобактерий с перспективой уменьшения количества инокулята, необходимого для точной идентификации микобактерий МАЛДИ-ТОФ МС, что могло бы ускорить диагностику туберкулеза и других нетуберкулезных микобактериальных инфекций.

Методы

Штаммы микобактерий

На первом этапе мы использовали 11 штаммов микобактерий, представляющих 7 видов комплекса *M. tuberculosis*, 12 штаммов микобактерий, представляющих 11 видов комплекса *M. avium*, и 20 дополнительных штаммов микобактерий, представляющих 16 дополнительных нетуберкулезных видов, взятых из нашей коллекции, чтобы создать эталонную базу данных (Таблица 1). На втором этапе все микобактерии, выделенные с февраля 2010 по май 2011 года от пациентов в Эталонной лаборатории по микобактериям Института Hospitalier Universitaire POLMIT, Марсель, Франция, были проанализированы методом МАЛДИ-ТОФ МС согласно плану. Изоляты культивировали в пробирках MGIT (Becton Dickinson, Pont-De-Claix, France) или на агаре с 5% овечьей кровью (BioMerieux, La Balme-les-Grottes, Франция) в течение 2-45 дней при 32°C или 37°C, как описано ранее [34,35]. Для уверенности в отсутствии каких-либо загрязняющих организмов в культуре использовалось окрашивание по Граму, а стандартная идентификация микобактерий выполнялась путем наблюдения кислотоустойчивых организмов после окрашивания по Циль-Нильсену, секвенирования *groV* для нетуберкулезных микобактерий [36] и секвенирования точного тандемного повтора D (ETR-D) для МБТК [12]. Мы протестировали два протокола инактивации микобактерий перед МАЛДИ-ТОФ МС путем инкубации 1 мл микобактериальной суспензии, полученной суспендированием колоний с твердой среды или 3 мл суспензии жидкой культуры микобактерий либо на водяной бане при 95°C в течение одного часа (Таблица 2, протокол А) [37], либо в 70% этаноле в течение 10 минут (таблица 2, протокол В) [19]. Эффективность каждого протокола инактивации тестировали в трех повторностях путем инокулирования 50 мкл инактивированных суспензий *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG и *M. fortuitum* в пробирки MGIT, которые далее инкубировали параллельно при 37°C. Отсутствие видимого роста после инкубации в течение 45 дней принималось в качестве доказательства эффективной инактивации микобактерий.

Таблица 1. Эталонные штаммы микобактерий, использованные для создания базы данных MALDI-TOF MS для идентификации микобактерий.

Комплекс <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<i>M. tuberculosis</i>	CIP 103471; H37Rv; CH6431
<i>M. africanum</i>	CIP 105147
<i>M. bovis</i>	CIP 671203; CIP 108541 ^T ; CIP105050
<i>M. bovis</i> BCG Tokyo	ATCC 35737
<i>M. caprae</i>	CIP105776
<i>M. microti</i>	CRBIP7.40
<i>M. canettii</i>	CIP 140010059 ^T
<i>M. pinnipedii</i>	ATCC-BAA-688
Комплекс <i>Mycobacterium avium</i>	
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	IWGMT49
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	CIP104244 ^T
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	CIP103963
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	CIP103317
<i>M. colombiense</i>	FI 04062
<i>M. chimera</i>	CIP 107892 ^T ; DSM 446232
<i>M. marseillense</i>	CIP 109828 ^T
<i>M. timonense</i>	CIP 109830 ^T
<i>M. bouchardurhonense</i>	CIP 109827 ^T
<i>M. intracellulare</i>	CIP104243 ^T
<i>M. indicus pranii</i> [*]	DSM 45239 [*]
<i>M. arosiense</i>	DSM 45069 ^T
Другие микобактерии	
<i>M. smegmatis</i>	CIP104444 ^T , ATCC 700084
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	DSM 43567, DSM 43435, DSM 43439, CIP104536 ^T
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	CIP108541 ^T , CIP108297
<i>M. aurum</i>	CIP104465 ^T
<i>M. chelonae</i>	CIP104535 ^T
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	CIP104524 ^T
<i>M. goodii</i>	CIP104529 ^T
<i>M. kansasii</i>	CIP104589 ^T
<i>M. marinum</i>	CIP104528 ^T
<i>M. phlei</i>	CIP105389 ^T
<i>M. xenopi</i>	CIP104035 ^T
<i>M. immunogenum</i>	CIP 106684 ^T
<i>M. lentiflavum</i>	CIP105465
<i>M. simiae</i>	CIP104531 ^T

^{*} *M. indicus pranii* не является валидированным видом
doi:10.1371/journal.pone.0024720.t001

Протокол МАЛДИ-ТОФ МС для микобактерий

Перед окончательной доработкой протокола для инактивирования микобактерий было протестировано несколько протоколов. Поскольку известно, что некоторые микобактерии, включая микобактерии МБТК, образуют тяжи, которые могут препятствовать анализу МАЛДИ-ТОФ МС, мы проверили несколько соединений на их способность солиubilизировать такие агрегаты. Мы протестировали инкубацию микобактерий в 0,5% растворе детергента Tween-20 (таблица 2, протокол 1) или бета-меркаптоэтаноле, химическом веществе, которое, как известно, восстанавливает дисульфидные связи в белках [38] (таблица 2, протокол 2). Мы также тестировали влияние использования ацетона (таблица 2, протокол 3) или дистиллированной воды в качестве промывочного раствора; абсолютного этанола для осаждения белка (таблица 2, протокол 4); и 0,1 М NaOH (таблица 2, протокол 5), 10% (об. / об.) трифторуксусной кислоты (TFA) (таблица 2, протокол 6), 0,1 М HCl (таблица

2, протокол 7) или 70% муравьиной кислоты для элюирования белков (таблица 2, протокол 8). Исходя из результатов этих предварительных испытаний, для окончательных экспериментов был использован протокол 8. Для каждого параметра мы сравнили результаты, полученные с *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG и *Mycobacterium fortuitum* с окончательным эталонным профилем, с точки зрения числового показателя достоверности идентификации (от 0 до 3), количества пиков в диапазоне 5000-20 000 m/z и интенсивности пиков, определенных программным обеспечением Flex Analysis 3.0 (Bruker Daltonics). Каждый тест проводился десять раз.

Таблица 2. Протоколы инактивации и растворители, использованные для подготовки микобактерий для идентификации с помощью MALDI-TOF MS.

Протокол	Протокол инактивации	
A	95 °C/60 минут	
B	70% этанол/ 10 минут	
	Тип и состав растворителя	
1	0.5% Твин-20	Диссоциация агрегатов микобактерий
2	5% β-меркаптоэтанол	Диссоциация агрегатов микобактерий
3	Ацетон	Промывка
4	Абсолютный этанол	Преципитация белков
5	0.1 M NaOH	Экстракция/элюция белков
6	10% ТФУ	Экстракция/элюция белков
7	0.1 M HCl	Экстракция/элюция белков
8	70% HCOOH	Экстракция/элюция белков

Чувствительность детектирования МАЛДИ-ТОФ МС

Для определения чувствительности нашего финального протокола были приготовлены серийные 10-кратные разведения от 10^8 до 10^3 микобактерий на миллилитр для *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG и *Mycobacterium fortuitum*. Для каждой суспензии, инокулят калибровали двумя методами. Первый – по подсчету среднего числа микобактерий, наблюдаемых в пяти областях на трех слайдах с микобактериями, прокрашенными по Циль-Нильсену, просматриваемых при увеличении 1000 X. Второй – по культивированию разведений на чашках с кровавым агаром в течение 5 недель и подсчету количества колоний. Для облегчения этих подсчетов использовали программное обеспечение для подсчета колоний - ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Чувствительность потом рассчитывали путем соотнесения числа колоний с кратностью разведений.

База данных МАЛДИ-ТОФ для микобактерий

Чтобы дополнить базу данных Bruker Daltonics, мы анализировали коллекцию эталонных штаммов для микобактерий с помощью протокола 8, как представлено ниже. Для каждого эталонного штамма микобактерий брали одну колонию с агаровой чашки (для твердой среды) и приблизительно 3 мл суспензии микобактерий (для жидкой среды) и далее их обрабатывали, как описано выше. Каждый эталонный штамм анализировали четыре раза, используя один и тот же протокол. Для каждого образца 1,5 мкл образца наносили на мишень из полированной стали MSP 96 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) и затем добавляли 1,5 мкл раствора матрицы (насыщенная α-циано-4-гидроксикоричная кислота, 50% ацетонитрил, 2,5% трифторуксусная кислота). Образцы подсушивали на воздухе в течение 5 минут перед исследованием на масс-спектрометре. Для проверки анализа всей мишени MSP 96 в качестве положительного контроля использовали бактериальный тестовый стандарт (белковый экстракт *Escherichia coli* DH5alpha, Bruker Daltonics ref 255343), а в качестве отрицательного контроля на каждой пластине использовали матричный раствор (α-циано-4-гидроксикоричная кислота) без внесения образца. Анализ проводили с использованием спектрометра Microflex MALDI TOF MS (Bruker Daltonics) на 337 нм с управляющим программным обеспечением Flex (Bruker Daltonics). Положительные ионы экстрагировали с ускоряющим напряжением 20 кВ в линейном режиме. Спектры анализировали в диапазоне m/z от 2000 до 20000. Четыре исходных спектра регистрировались автоматически с использованием программного обеспечения Flexcontrol 3.0, а затем сравнивались с базой данных Bruker Daltonics с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 2.0 Bruker Daltonics. Для валидации анализа с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper, положительный контроль должен был быть идентифицирован как *E. coli* с числовым значением

достоверности идентификации ≥ 2 , а отрицательный контроль должен был дать неидентифицирующее числовое значение достоверности идентификации ≤ 1.7 . Профили 11 контрольных штаммов для комплекса *M. tuberculosis*, 12 эталонных штаммов для комплекса *M. avium* и 20 эталонных штаммов для других некуберкулезных микобактерий сравнивали и анализировали с использованием программного обеспечения Biotyper 2.0, и эти МАЛДИ-ТОФ МС спектры были введены в локальную базу данных *Mycobacterium*, которая была затем объединена с базой данных Bruker Daltonics с 3438 записями (июнь 2010 г.).

Идентификация микобактерий с помощью МАЛДИ-ТОФ МС

Все клинические изоляты *Mycobacterium*, полученные из Эталонной лаборатории по микобактериям Institut Hospitalier Universitaire POLMIT, Марсель, Франция согласно плану с февраля 2010 года по май 2011 года, были проанализированы с использованием протокола 8, как представлено ниже. Для идентификации каждого клинического изолята соответствующие спектры затем сравнивали со спектрами в локальной базе данных *Mycobacterium*, объединенной с базой данных Bruker Daltonics, с использованием программного обеспечения Biotyper 2.0.

Результаты

Протокол МАЛДИ-ТОФ МС для микобактерий

Мы не наблюдали роста микобактерий *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG и *M. fortuitum* в течение 45-дневной инкубации как после термической инактивации, так и после 10-минутной инкубации с 70% этанолом. Однако инкубация в этаноле микобактерий, выращенных в Middlebrook 7H9, давала белковые профили более низкого качества (рис. 1, а), чем те, которые были получены после термической инактивации. Таким образом, в наш окончательный протокол была включена 1-часовая инкубация при 95°C. Аналогично, поскольку инкубация микобактерий в 0,5% Tween-20 дала спектры лучшего качества, чем для микобактерий, исследуемых параллельно без обработки Твин-20 (таблица 3.1, рисунок 1, часть b), обработка 0,5% Твин-20 была включена в наш окончательный протокол. Мы обнаружили, что суспендирование микобактерий в β -меркаптоэтаноле не улучшало качество спектров (таблица 3.2, часть 1 части 1), поэтому β -меркаптоэтанол не использовали в нашем окончательном протоколе. Затем мы проверили использование ацетона и дистиллированной воды в качестве промывающих растворов. Между спектрами не наблюдалось никакой разницы; в обоих случаях была получена адекватная идентификация с почти одинаковой интенсивностью и числовым значением достоверности идентификации (Таблица 3.3; Рисунок 1, часть d). Ацетон занимал больше времени на манипуляции и высыхание, чем дистиллированная вода, которую поэтому сохранили в окончательном протоколе. Мы наблюдали, что осаждение белка с использованием абсолютного этанола (таблица 3.4, часть 1) не улучшало качество спектров по сравнению с использованием только дистиллированной воды. Мы также протестировали несколько растворителей для экстракции и элюции белка. Пиков в диапазоне 5 000-15 000 кДа не наблюдали при использовании 0,1 М NaOH (таблица 3.5, рис. 1 часть f) или 0,1 М HCl (таблица 3.6, рис. 1 часть f), наблюдался только один пик при использовании 10% трифторуксусной кислоты (таблица 3.7, рис. 1 часть g) и 11 пиков были получены при использовании 70% HCOOH (таблица 3.8, рис. 1 часть i). Поэтому в наш окончательный протокол мы включили 70% HCOOH в сочетании со 100% ацетонитрилом. Протокол 8 (таблица 3.9; рисунок 1 часть i) использовали в качестве окончательного. Колонии каждого изолята собирали в пробирку "Эппендорф" с винтовой крышкой, содержащей 500 мл воды качества для ВЭЖХ и 0,5% Твин-20 и инактивировали нагреванием при 95 ° С в течение одного часа [37]. Затем суспензии микобактерий дважды промывали 500 мл воды ВЭЖХ-качества и центрифугировали при 13000 g в течение 10 мин. Осадок встряхивали вместе с 500 мл воды ВЭЖХ-качества и 0,3 г промытых кислотой стеклянных шариков (диаметр ≤ 106 мкм, Sigma) в приборе BIO 101 FastPrep (Qiogene, Страсбург, Франция) на уровне 6,5 (полная скорость) в течение 3 мин. Суспензию центрифугировали при 13 000 g в течение 10 мин. Затем осадок ресуспендировали в 5-50 мкл 70% HCOOH и 5-50 мкл 100% ацетонитрила в зависимости от объема осадка. Суспензию центрифугировали при 11 000 g в течение 1 мин и 1,5 мкл надосадочной жидкости наносили на мишень (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) в четырех повторях. Наконец, добавляли 1,5 мкл матричного раствора (насыщенной циано-4-гидроксикоричной кислоты, 50% ацетонитрила, 2,5% ТФУ) и оставляли сокристаллизоваться вместе с пятном образца при комнатной температуре.

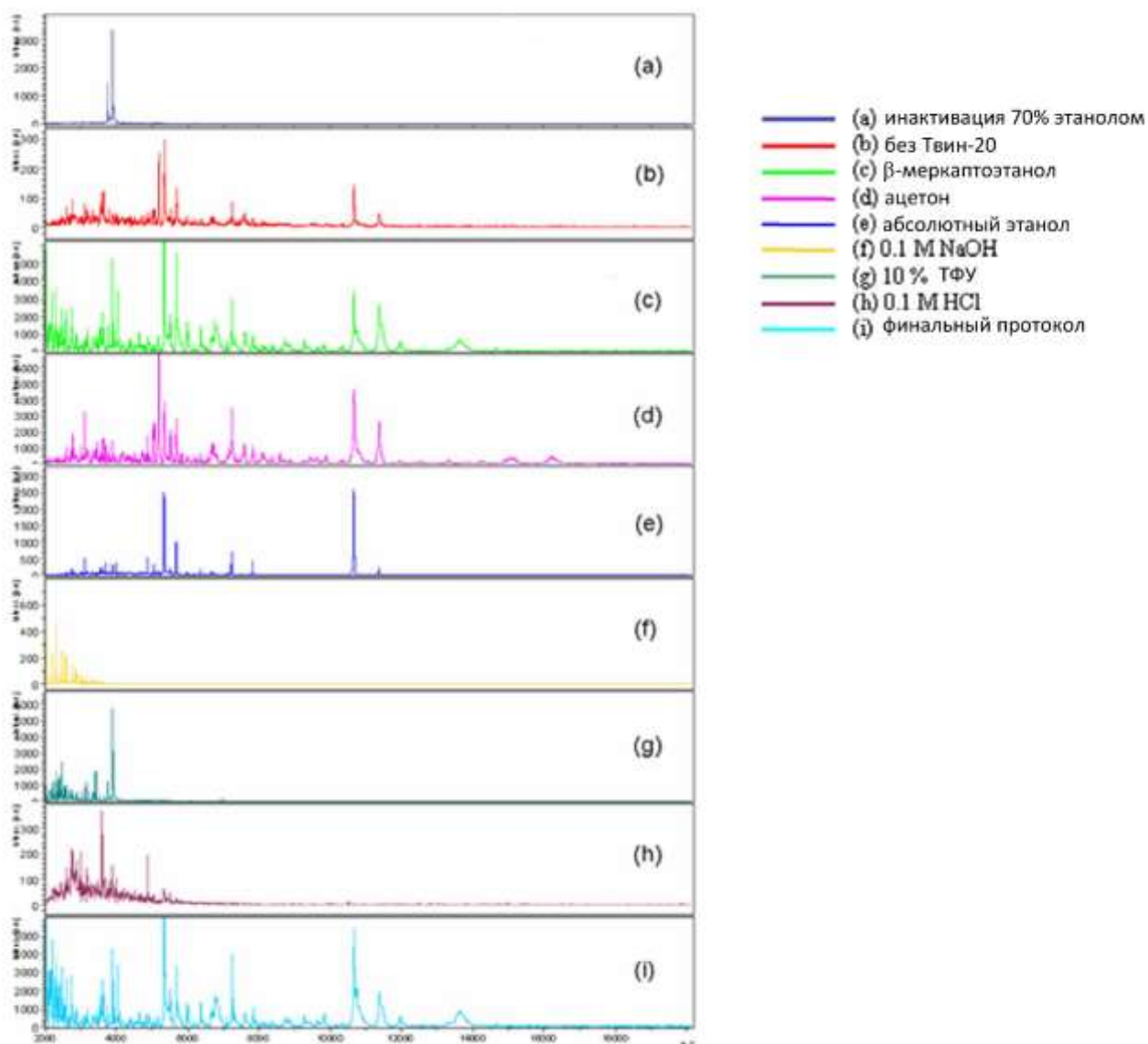


Рисунок 1. Спектры МАЛДИ-ТОФ МС, полученные для штамма *M. tuberculosis* H37Rv при использовании протоколов, протестированных в этой работе. Протокол А использовали везде, где не указано иное; протокол В использовался там, где упоминается (строка 2).
doi:10.1371/journal.pone.0024720.g001

База данных МАЛДИ-ТОФ для микобактерий

При использовании нашего оптимизированного протокола, нижний предел обнаружения МАЛДИ-ТОФ МС составлял около 10^5 КОЕ/мл, что соответствует 10^3 микобактериям, нанесенным на мишень МАЛДИ-ТОФ МС. Все контрольные штаммы микобактерий, исследованные методом масс-спектрометрии, имели специфический для вида профиль спектра. Спектральные профили были депонированы в базу данных по спектрам, которая является внутренней базой данных MALDI-TOF больницы La Timone, и которая будучи объединенной с базой данных Bruker дала 141 эталонный спектр, состоящий из 62 видов *Mycobacterium* (таблица S1).

Идентификация бактерий методом MALDI-TOF

Во всех случаях лунки отрицательного контроля приводили либо к отсутствию видимых пиков, либо к слабым профилям, которые не были интерпретированы системой, а положительные контроли дали ожидаемый белковый профиль. В общей сложности 124 клинических изолята были согласно плану проанализированы в течение 16-месячного периода МАЛДИ-ТОФ МС, и все тестируемые микобактериальные изоляты дали видимый

профиль белка с числовым значением достоверности идентификации от 2 до 2,7. Из клинических изолятов 87 были идентифицированы как *M. tuberculosis*, 17 как *M. avium* subsp. *hominisuis*, 7 как *M. intracellulare*, один как *M. marsiliense*, 7 как *M. chelonae*, 2 как *M. abscessus*, 2 как *M. kansasii* и один как *M. fortuitum*. Во всех случаях идентификация МАЛДИ-ТОФ МС совпадала с молекулярной идентификацией, которую рутинно проводили в нашей лаборатории, используя либо секвенирование ETR-D для идентификации видов МБТК [12], либо частичное секвенирование *groV* для других микобактерий [36].

Таблица 3. Спектры, полученные для *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, при использовании протестированных протоколов.

Протокол	Число пиков	Средняя интенсивность (+/- std. отклонение) преобладающих пиков						Среднее числовое значение достоверности идентификации
		5340 m/z	5500 m/z	5690 m/z	10670 m/z	10700 m/z	11380 m/z	
(1)	8	270(+/-78)	171(+/-57)	139(+/-45)	118(+/-37)	61(+/-14)	44(+/-12)	1.45
(2)	8	5846(+/-2797)	1804(+/-1007)	2544(+/-1248)	1968(+/-960)	1400(+/-594)	1518(+/-213)	1.87
(3)	11	5349(+/-4850)	4037(+/-3835)	4314(+/-2912)	2847(+/-2851)	2077(+/-2115)	2557(+/-2229)	2.17
(4)	11	4798(+/-5400)	2531(+/-2324)	1950(+/-2252)	1681(+/-1709)	949(+/-1258)	675(+/-1380)	2.43
(5)	0	-	-	-	-	-	-	-
(6)	0	-	-	-	-	-	-	-
(7)	1	1007 (+/- 260)	-	-	-	-	-	-
(8)	11	6166(+/-2477)	2910(+/-2503)	3122(+/-2212)	2276(+/-1580)	2435(+/-1539)	2148(+/-1708)	2.51

Тесты были проделаны 10 раз с использованием протокола инактивации А.
doi:10.1371/journal.pone.0024720.t003

Обсуждение

Спектры белков, полученные из эталонных и клинических штаммов микобактерий в этом исследовании, были интерпретированы как точные и специфичные. В каждом случае, положительные контрольные образцы дали ожидаемые и идентифицирующие профили, тогда как отрицательные контрольные образцы дали либо не обнаруживаемые пики, либо слабые профили, которые не были идентифицированы системой. Более того, идентичность как эталонных штаммов, так и клинических изолятов была подтверждена частичным секвенированием *groV* параллельно с идентификацией МАЛДИ-ТОФ МС [36]. В этом исследовании спектры МАЛДИ-ТОФ МС были получены после инактивации изолятов. Микобактерии комплекса *M. tuberculosis* являются опасными организмами, которые, как было обнаружено ранее, ответственны за случаи приобретенного в лаборатории туберкулеза среди персонала лаборатории [39]. Соответственно, *M. tuberculosis* должны быть инактивированы вне бокса биологической безопасности до последующей обработки, чтобы избежать потенциального заражения персонала лаборатории [39,40]. Поскольку принадлежность кислотоустойчивых бацилл к туберкулезным возбудителям не может быть определена путем микроскопического наблюдения, мы предлагаем, чтобы систематическая инактивация кислотоустойчивых бацилл была гарантирована до их идентификации МАЛДИ-ТОФ МС. Хотя в некоторых предыдущих исследованиях не упоминалось, как микобактерии были инактивированы до анализа МАЛДИ-ТОФ МС [21,33], этанол использовали для этой цели [19,41]. Мы заметили, что последний протокол основывался на центрифугировании микобактерий до инактивации этанолом, что сопряжено с риском образования аэрозолей микобактерий комплекса *M. tuberculosis*, которые потенциально опасны для персонала лаборатории. Мы стремились избежать какого-либо центрифугирования неинактивированных микобактерий и поэтому решили инактивировать микобактерии путем нагревания, как в ранее описанной процедуре, которая эффективно инактивирует микобактерий, включая микобактерии МБТК, в течение 30 минут при 95°C [18,37,42,43]. Мы также были обеспокоены тем, что использование этанола может мешать качеству спектров, поскольку этанол осаждает белки. Действительно, когда мы использовали этанол для уничтожения микобактерий в жидкой среде, он осаждал все белки в среде, в том числе белки микобактерий. Как сообщалось ранее [21], состав среды (жидкая среда Middlebrook 7H9 или твердая среда - кровяной агар) не мешала идентификации с помощью масс-спектрометрии, особенно после включения этапов промывки. В этом исследовании добавление Tween-20 во время фазы инактивации повысило качество МАЛДИ-ТОФ МС-спектров микобактерий. Tween-20 - детергент, который разрушает тяжи, образованные микобактериями. Компания Брукер и авторы более поздней работы [18] использовали для этой операции микропестик. Однако, мы решили использовать Tween-20, с которым легче и экономичнее работать. Разрушение клеточной стенки было еще одним важным шагом, способствующим экстракции микобактериальных белков. Действительно, мы ранее наблюдали, что разрушение прочной клеточной стенки

микобактерий было необходимо для их надлежащего молекулярного обнаружения [44]. Это также имело место в случае молекулярного обнаружения метаногенных архей, другой группы прокариот с прочной клеточной стенкой, при использовании либо молекулярного подхода [45], либо МАЛДИ-ТОФ МС (Dridi and Drancourt, неопубликованные данные). Использование описанного здесь протокола позволило нам уменьшить требуемый инокулят микобактерий до 10^5 КОЕ/мл, что является самым низким описанным инокулятом для эффективной идентификации микобактерий МАЛДИ-ТОФ МС. Хотя в первоначальных исследованиях и в некоторых недавних работах использовали некалиброванный инокулят [18,19,21], в самых недавних исследованиях использовали высоко концентрированный (10^8 - 10^9 КОЕ/мл) инокулят [33]. Получение такого высококонцентрированного инокулята требует продолжительного, трудоемкого культивирования и подвергает лабораторный персонал контакту с потенциально опасными патогенами в течение продолжительных периодов времени. За последние пять лет наша эталонная лаборатория микобактериологии, обслуживающая многонациональный регион с 1-2 миллионами жителей, выявила 354 новых случая заражения микобактериями, в том числе 295 новых случаев заражения *M. tuberculosis* и 33 новых случая заражения МБАК (с 2005 по 2009 год). Другими, не туберкулезными, микобактериями, выделенными в нашей лаборатории в этот период, были *M. chelonae* (7 случаев), *M. lentiflavum* (5 случаев), *M. fortuitum* (3 случая), *M. xenopi* (3 случая), *M. gordonae* (3 случая), *M. kansasii* (2 случая), *M. marinum* (2 случая) и *M. phocaicum* (1 случай). Мы создали базу данных МАЛДИ-ТОФ МС, которая включала в себя организмы *Mycobacterium*, наиболее часто выявляемые в течение последних нескольких лет. Эта локальная база данных превосходно дополнила первоначальную базу данных Bruker Daltonics, которая содержала около 80 спектров *Mycobacterium*, представляющих 40 видов *Mycobacterium* (версия июня 2010 года) (Таблица S1). Хотя эта база данных обогащена видами *Mycobacterium*, наиболее часто встречающимися в нашем географическом регионе, тем не менее, это самая большая база данных *Mycobacterium* MALDI-TOF, которая когда-либо была опубликована, включающая 62 вида и 177 эталонов (по сравнению с предыдущими сообщениями, состоящими из 4-53 видов и 5-53 эталонных спектров [18-21]). Хотя организмы комплекса *M. tuberculosis* и комплекса *M. avium* вместе представляли более 90% изолятов *Mycobacterium* в нашей лаборатории, база данных Bruker Daltonics включала только восемь спектров *M. tuberculosis* и шесть спектров *M. avium* из 40 спектров *Mycobacterium*. В то же время, как мы ранее отмечали, для точной идентификации культивируемых бактерий с помощью МАЛДИ-ТОФ МС необходима библиотека, содержащая не менее 10 эталонных спектров [25]. Поэтому в данной работе мы расширили базу данных Bruker Daltonics на 37%, добавив в общей сложности 43 эталонных МАЛДИ-ТОФ МС-спектра, и мы удвоили количество эталонных спектров комплекса *M. tuberculosis* и утроили их число для комплекса *M. avium*. В этом исследовании мы оценили перспективное использование МАЛДИ-ТОФ МС для рутинной идентификации изолятов микобактерий из образцов пациентов, у которых предполагали туберкулез легких. Хотя в предыдущих исследованиях было доказано, что МАЛДИ-ТОФ МС может использоваться для «первой линии» идентификации микобактерий [18,19,21], эти исследования были основаны на ретроспективном анализе микобактерий, полученных из коллекций. Некоторые исследования, включающие изоляты комплекса *M. tuberculosis* и нетуберкулезных микобактерий, страдали от ограничений, которые препятствовали бы их применению для обычного лабораторного использования.

Итак, МАЛДИ-ТОФ МС была успешно адаптирована для рутинной идентификации микобактерий. Этот революционный метод позволяет более легко и быстро диагностировать микобактериальные патогены по сравнению с обычными фенотипическими методами идентификации. Таким образом, МАЛДИ-ТОФ МС представляет собой альтернативный подход «первой линии» к рутинной идентификации подавляющего большинства бактерий, обычно культивируемых в клинической лаборатории микробиологии [25,32].

Дополнительная информация

Таблица S1 Список из 62 видов *Mycobacterium*, включенных в базу данных MALDI-TOF. Эта база данных объединяет базу данных Bruker и созданные нами базы данных. Для каждого вида/подвида указано количество эталонных спектров, в общей сложности 177 ссылок. (DOC).

Ссылки:

1. Djelaoudji Z, Raoult D, Drancourt M (2011) Palaeogenomics of *Mycobacterium tuberculosis*: epidemic bursts with a degrading genome. *Lancet Infect Dis*; in press.
2. Guy ES, Mallampalli A (2008) Managing tuberculosis in the 21st century: existing and novel drug therapies. *Ther Adv Respir Dis* 2: 401–408.

3. McGrath EE, McCabe J, Anderson PB (2008) Guidelines on the diagnosis and treatment of pulmonary non-tuberculous mycobacteria infection. *Int J Clin Pract* 62: 1947–1955.
4. Chou CH, Chen HY, Chen CY, Huang CT, Lai CC, et al. (2011) Clinical features and outcomes of disseminated infections caused by non-tuberculous mycobacteria in a university hospital in Taiwan, 2004–2008. *Scand J Infect Dis* 43: 8–14.
5. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, et al. (2011) Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med* 28: 1626–1633.
6. Pfyffer G (2007) Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection and staining procedures. In Murray PR, Barron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. *Manual of clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington DC. pp 543–572.
7. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, et al. (2006) Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Eng J Med* 355: 539–550.
8. Robledo JA, Meji'a GI, Morcillo N, Chaco'n L, Camacho M, et al. (2006) Evaluation of a rapid culture method for tuberculosis diagnosis: a Latin American multi-center study. *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 613–619.
9. Butler WR, Jost KC, Jr., Kilburn JO (1991) Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 29: 2468–2472.
10. Le'vy-Fre'bault VV, Portaels F (1992) Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* 42: 315–323.
11. Djelouadji Z, Raoult D, Daffe' M, Drancourt M (2008) A single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e253.
12. Djelouadji Z, Arnold C, Gharbia S, Raoult D, Drancourt M (2008) Multispacer sequence typing for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. *PLoS ONE* 3: e2433.
13. Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemai'tre N (2011) Comparison of the Xpert MTB/RIF Test with an IS6110-TaqMan Real-Time PCR Assay for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory and Nonrespiratory Specimens. *J Clin Microbiol* 49: 1772–1776.
14. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, et al. (2010) Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Eng J Med* 9: 1005–1015.
15. Suzuki K, Higuchi T (2007) Improvement of routine works and quality control in mycobacterial laboratory. *Kekkaku* 82: 217–227.
16. Marti'n A, Herranz M, Lirola MM, Fern'andez RF, INDAL-TB group, et al. (2008) Optimized molecular resolution of cross-contamination alerts in clinical mycobacteriology laboratories. *BMC Microbiol* 14: 30.
17. Castro C, Gonz'alez L, Rozo JC, Puerto G, Ribo'n W (2009) Biosafety evaluation of the DNA extraction protocol for *Mycobacterium tuberculosis* complex species, as implemented at the Instituto Nacional de Salud, Colombia. *Biomedica* 29: 561–566.
18. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM (2011) Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 49: 1790–1794.
19. Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, Dauphin B, Carbonnelle E, et al. (2010) Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48: 4481–4486.
20. Hettick JM, Kashon ML, Slaven JE, Ma Y, Simpson JP, et al. (2006) Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDITOF MS and biostatistical analysis. *Proteomics* 6: 6416–6425.

21. Pignone M, Greth KM, Cooper J, Emerson D, Tang J (2006) Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 44: 1963–1970.
22. Anhalt J, Fenselau C (1975) Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* 47: 219–225.
23. Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain JM (2009) MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents* 34: 467–470.
24. Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, Beretti JL, Le Bourgeois M, et al. (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.
25. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, et al. (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.
26. La Scola B, Raoult D (2009) Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry. *Plos ONE* 4: e8041.
27. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR (2010) Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48: 444–447.
28. Ferreira L, Sa´nchez-Juanes F, Mun˜oz-Bellido JL, Gonza´lez-Buitrago JM (2010) Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect* 12: doi: 10.1111/j.1469–0691.2010.03339.x.
29. Prod´hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol* 48: 1481–1483.
30. 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.
31. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, Dauphin B, Bille E, 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.
32. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D (2010) MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* 5: 1733–1754.
33. Hettick JM, Kashon ML, Simpson JP, Siegel PD, Maruzek GH, et al. (2004) Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 76: 5769–5776.
34. Drancourt M, Raoult D (2007) Cost-effectiveness of blood agar for isolation of mycobacteria. *PLoS Negl Trop Dis* 28: e83.
35. Drancourt M, Carrieri P, Ge´vaudan MJ, Raoult D (2003) Blood agar and *Mycobacterium tuberculosis*: the end of a dogma. *J Clin Microbiol* 41: 1710–1711.
36. Ade´kambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M (2006) *rpoB* gene sequencebased characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 133–143.
37. Djelouagji Z, Drancourt M (2006) Inactivation of cultured *Mycobacterium tuberculosis* organisms prior to DNA extraction. *J Clin Microbiol* 44: 1594–1595.

38. McAlpin CR, Cox CR, Matyi SA, Voorhees KJ (2010) Enhanced matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of bacteriophage major capsid proteins with beta-mercaptoethanol pretreatment. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24: 11–14.
39. Miller AK, Tepper A, Sieber K (2002) Historical risks of tuberculin skin test conversion among non-physician staff at a large urban hospital. *Am J Ind Med* 42: 228–235.
40. Woith WM, Volchenkov G, Larson JL (2010) Russian health care workers' knowledge of tuberculosis and infection control. *Int J Tuberc Lung Dis* 14: 1489–1492.
41. Elbir H, Abdel-Muhsin AM, Babiker A (2008) A one-step DNA PCR-based method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex grown on Lowenstein-Jensen media. *Am J Trop Med Hyg* 78: 316–317.
42. Bemer-Melchior P, Drugeon HB (1999) Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA typing analysis. *J Clin Microbiol* 37: 2350–2351.
43. Doig C, Seagar AL, Watt B, Forbes KJ (1992) The efficacy of the heat killing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Pathol* 55: 778–779.
44. El Khe'chine A, Henry M, Raoult D, Drancourt M (2009) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in the stools of patients with pulmonary tuberculosis. *Microbiology* 155: 2384–2389.
45. Dridi B, Henry M, El Khe'chine A, Raoult D, Drancourt M (2009) High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS One* 4: e7063.