

Масс-спектрометрические методы дискриминации и типирования микобактерий

Е.Шитиков; Е.Ильина; Л.Черноусова; А. Боровская; И.Рукин; М.Афанасьев; Т.Смирнова; А.Воробьева; Е.Ларионова; С. Андреевская; М. Кострцева; В. Говорун

Идентификацию и типирование микобактерий важно проводить не только в эпидемиологических целях, но и в целях определения чувствительности к антибиотикам, в диагностических целях.

В данной статье описывается разработка и валидация альтернативных методов видовой идентификации и типирования микобактерий на основе MALDI – Tof масс-спектрометрии.

Для анализа было взято 383 клинических изолята, которые включали в себя 348 штаммов бактерий микотуберкулезного комплекса (MTBC) (342 штамма микобактерии туберкулеза, и 6 штаммов *m. bovis*) и 35 штаммов нетуберкулезных микобактерий (NTM) представленных 16 различными видами. Было проведено прямое белковое профилирование (DBP) с помощью MALDI – Tof масс-спектрометрии. Кластерный анализ DBP спектров разделил спектры на две больших группы, это деление соответствовало делению на MTBC и NTM группы и продемонстрировало возможность идентификации изолятов до уровня вида. Был разработан и валидирован протокол сполиготипирования на основе масс-спектрометрии, он полностью совпал с данными классического сполиготипирования. Наши данные позволили предположить что MALDI – Tof масс-спектрометрия имеет потенциал как быстрая и воспроизводимая платформа для идентификации и типирования микобактерий.

Введение

Род *Mycobacterium* состоит примерно из 140 гетерогенных быстро – и медленно растущих видов бактерий. Кол-во заболеваний, вызываемых микобактериями, существенно увеличилось за последние несколько десятилетий. Бактерии микотуберкулезного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis complex*, MTBC) стали основной причиной смерти во многих развивающихся странах, что продолжает быть существенной проблемой общественного здравоохранения во всем мире. Нетуберкулезные микобактерии (NTM) ответственны за микобактериозы и многие оппортунистические инфекции как у лиц с ослабленным иммунитетом, так и у иммунокомпетентных лиц. Точная и окончательная дифференциация MTBC и NTM стала важной задачей в связи с увеличением кол-ва заболеваний и антибиотикорезистентности среди представителей данного рода. Детальное молекулярное типирование MTBC изолятов значительно облегчило понимание эпидемиологии этих патогенов. Видовая идентификация микобактерий важна для эпидемиологических целей, здравоохранения и терапевтических целей. Традиционно микобактерии идентифицируются за счет их фенотипов, таких как морфологические черты, темпы роста, и предпочтительная температура роста, пигментация и биохимические профили. Эти методы хорошо известны и стандартизованы.

Тем не менее, эти методы тестирования остаются сложными и трудоемкими, как требующие пока еще 12 недель для окончательной положительной идентификации микроорганизма, и результаты этих исследований часто не бывают готовы вовремя для принятия клинических решений. В последнее десятилетие достижения молекулярных методов диагностики позволили разработать

быстрые, дешевые и надежные методы идентификации многих видов микобактерий за счет молекулярных маркеров

И все равно данные методы интенсивно используются в лабораторной диагностике, хоть и могут быть применены для идентификации ограниченного количества видов. Если требуется дальнейшая хар-ка образцов, то необходимо использовать дополнительные методы, которые обычно подразумевают иную инструментальную базу. Целью данного исследования является продемонстрировать, что комплексный подход на основе MALDI TOF масс-спектрометрии подходит для быстрой и точной идентификации и типирования микобактерий.

В последнее время прямое бактериальное профилирование с помощью TOF масс-спектрометрии было предложено как эффективный подход для быстрой и точной идентификации микроорганизмов (Leuschner et al., 2004; Lynn et al., 1999; Mandrell et al., 2005; Mellmann et al., 2008), во многом преодолевающий ограничения классических биохимических методов идентификации. Эта технология основана на анализе уникального масс-спектра получаемого из белкового экстракта микробной клетки (Fox, 2006). Некоторые авторы использовали MALDI-ToF MS для идентификации микобактерий (Hettick et al., 2006; Lotz et al., 2010; Pignone et al., 2006; Saleeb et al., 2011), но глобальные экспериментальные данные до сих пор существуют в ограниченном кол-ве. Мы верим, что в будущем всеобъемлющее развитие баз данных по прямому белковому профилированию даст нам возможность быстрой и воспроизводимой видовой идентификации микобактерий

С другой стороны процедура минисеквенирования с детекцией посредством MALDI-ToF MS может быть использована для идентификации генетических маркеров. Этот метод включает в себя следующие этапы: ПЦР реакцию, затем дефосфорилирование остатков нуклеотидов и праймеров, затем удлинение праймера в присутствии дидезоксинуклеотидов и очистка продуктов реакции для дальнейшего масс-спектрометрического анализа. Данный метод использовался для генотипирования *M. tuberculosis* (Honisch et al., 2010) и анализа генетических маркеров лекарственной устойчивости (Afanas'ev et al., 2007, 2011; Ikryannikova et al., 2007).

Этот очерк описывает развитие и валидацию новых методов видовой идентификации микобактерий, скомбинированных на одной и той же масс-спектрометрической платформе. Обе созданные методики являются открытыми и простыми в использовании и могут стать полезным инструментом для глобальных эпидемиологических целей.

Эта работа была ранее презентована на 41-ой всемирной конференции по здоровью легких Международного общества по борьбе с туберкулезом в Германии в 2010 году.

Материалы и методы

Штаммы

Исследование включало в себя 383 клинических изолята, представляющих собой 2 вида МТВС (342 штамма *M. tuberculosis* и 6 штаммов *M. Bovis*) и 16 видов NTM (35 штаммов). Штаммы были

получены в отделе микробиологии центра исследования туберкулеза РАМН (Москва, Россия). Образцы собирались с 1993 года и хранились в лабораторном банке.

Начальный этап видовой идентификации был проведен следующим образом :

Гидролиз с помощью Tween 80 (5 и 10 дней), удаление нитратов, погружение в 5% хлорид натрия, рост в присутствии ТСН (гидразид тиофен-2-карбоновой кислоты), арилсульфатазы (3 и 14 дней), уреазы, термостойкой (68 С) каталазы; поглощение железа, производство ниацина, удаление теллурита, пиразинамидазы (4 и 7 дней), бета-глюкозидазы, кислой фосфатазы, цитратный тест, ингибирование полимиксина В и ципрофлоксацина. (Holt et al., 1994; Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2003)

Рост при температурах 25,28,31,37, 42С, пигментация, темпы роста и характеристики колоний также были оценены. Детальная информация по данным штаммам представлена в таблице 1.

Bacterial strains examined in current study.

Verified groups of mycobacteria	Initial species identification (N tested)	GenoType Mycobacterium CM/AS (N tested)	16S rRNA gene and ITS sequencing (N tested)
<i>Rapidly growing mycobacteria</i>			
<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> (3)	<i>M. abscessus</i> (3)	<i>M. abscessus</i> (3)
<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i> (2)	<i>M. chelonae</i> (2)	<i>M. chelonae</i> sqv. I / Mche A ^b (2)
<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. diernhoferi</i> (1)	<i>Mycobacterium</i> spp. (1)	<i>M. diernhoferi</i> (1)
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> (5)	<i>M. fortuitum</i> (5)	<i>M. fortuitum</i> sqv. I ^b (5)
<i>M. neoaurum</i>	<i>M. neoaurum</i> (1)	<i>Mycobacterium</i> spp. (1)	<i>M. neoaurum</i> (1)
<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i> (2)	<i>M. peregrinum</i> (2)	<i>M. peregrinum</i> (2)
<i>M. phlei</i>	<i>M. phlei</i> (1)	<i>M. phlei</i> (1)	<i>M. phlei</i> (1)
<i>M. smegmatis</i>	<i>M. smegmatis</i> (2) <i>M. phlei</i> (1)	<i>M. smegmatis</i> (3)	<i>M. smegmatis</i> (3)
<i>Slowly growing mycobacteria</i>			
<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> (5)	<i>M. avium</i> (6)	<i>M. avium</i> sqv. I (3) and sqv. II ^b (3)
	<i>M. kansasii</i> (1)		
<i>M. gastri</i>	<i>M. gastri</i> (1)	<i>M. gastri</i> (1)	<i>M. gastri</i> Mga A ^b (1)
<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> (2)	<i>M. gordonae</i> (2)	<i>M. gordonae</i> sqv. II ^b (2)
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chelonae</i> (1)	<i>M. intracellulare</i> (2)	<i>M. intracellulare</i> sqv. V ^b (2)
	<i>M. smegmatis</i> (1)		
<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> (3)	<i>M. kansasii</i> (3)	<i>M. kansasii</i> sqv. I / Mka A ^b (3)
<i>M. simiae</i>	<i>M. simiae</i> (1)	<i>M. simiae</i> (1)	<i>M. simiae</i> sqv. I ^b (1)
<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i> (1)	<i>M. scrofulaceum</i> (1)	<i>M. scrofulaceum</i> (1)
<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i> (1)	<i>M. xenopi</i> (1)	<i>M. xenopi</i> sqv. I ^b (1)
<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> (6)	*MTBC (6)	MTBC (6)
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> (342)	MTBC (26)	MTBC (26)
Total	383	67	67

Таблица 1: Бактериальные штаммы, использованные в исследовании

Прямое бактериальное профилирование

Виды микобактерий были выращены на среде Левенштейна-Дженсен (Becton Dickinson, USA). Быстро и медленно растущие микобактерии культивировались одну или 2 недели преимущественно. После культивации клетки помещались в 1,5 мл пробирку (Eppendorf, Germany), заполненную 300 мл сверхчистой воды (Fluka, Germany), чтобы отмыть их от среды. После перемешивания при комнатной температуре в течение 5 минут, суспензия центрифугировалась 5 минут при 10 000 g. Полученный осадок ресуспендировался в таком же объеме сверхчистой воды. На следующем этапе добавлялось 900 мкл 96% этанола. После центрифугирования 30 минут при 7000 g

муравьиной кислоты (Sigma–Aldrich, Germany) добавлялось к осадку, раствор перемешивался интенсивно в течение 5 минут. Затем добавлялось 20 мкл ацетонитрила (Sigma–Aldrich, Germany). Раствор опять перемешали и отцентрифугировали.

2 мкл супернатанта было помещено на MALDI мишень (MSP 96 target ground steel; Bruker Daltonics, Germany) в пяти повторностях и были оставлены высыхать на воздухе при комнатной температуре. Насыщенный раствор альфа-циано-гидроксикоричной кислоты (CHCA) (Bruker Daltonics, Germany) был приготовлен в 1 мл 50% ацетонитрила, 2,5% трифторуксусной кислоты и был использован как матрица. В конце 2 мкл раствора матрицы было нанесено на высушенный супернатант и высушено при комнатной температуре. Все шаги пробоподготовки были произведены в 1,5 мл пробирке (Eppendorf, Germany). Все используемые растворы были MS качества. Спектры снимались в диапазоне от 2000 до 20 000 Da, но большинство пиков приходилось на интервал 2000-10000. В качестве калибровочного стандарта использовался Bruker bacterial standard. Необходимое значение параметров сигнал/шум и разрешение было достигнуто для всех спектров. Масс-спектры были получены на приборе AutoFex (Bruker Daltonics, Germany) MALDI-ToF MS. Тридцать масс-спектров (5 ячеек мишени и 6 точек на одной ячейке) были сняты для каждого штамма и обработаны с помощью программы MALDI Biotyper v.2.0 (Bruker Daltonics, Germany). Дополнительная обработка спектров для визуального анализа была произведена с помощью программы FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Germany).

Выделение ДНК

Выделение ДНК из анализируемых образцов было произведено набором “Политуб” (Литех; Россия). При необходимости образцы ДНК замораживались при температуре -20°C.

Генотипирование

Генотипирование проводилось с помощью набора CM/AS (Hain Lifescience, Германия). Наборы использовались для детекции MTBC (наборы не позволяют отличать *M. tuberculosis* от *M. bovis*) и идентификации наиболее распространенных NTM видов. Исследование было проведено в соответствии с инструкцией производителя. Процесс включал в себя ПЦР амплификацию, гибридизацию продуктов ПЦР с зондами и тест-полосками и детекцию связанных продуктов. Тест полоски были зафиксированы в таблице с данными. Преобразование конъюгата, универсальные контрольные линии и контрольные линии рода были тщательно проанализированы для каждого изолята.

Были задокументированы линии зонда. В соответствии с рекомендациями производителя учитывались только бэнды (полоски) с интенсивностью сравнимой или большей, чем интенсивность универсальной контрольной линии. Любые изоляты не идентифицированные тестом the GenoType CM были проанализированы с помощью теста Geno-Type AS.

Секвенирование гена 16S рРНК и 16S-23S рДНК внутреннего транскрибируемого спейсера

ПЦР реакция была проведена в реакционной смеси, содержащей 66 mM Tris–HCl (pH 9.0), 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 250 μM каждого dNTP, 1 U Taq ДНК полимеразы (Promega, США) и 5 пикамоль каждого праймера в конечном объеме 10 мкл; с использованием амплификатора DNA Engine Tetrad 2 (MJ Research, США).

Для амплификации 16S рДНК использовались следующие праймеры:

271f (forward) следующей последовательности

(5'-CTTAACACATGCAAGTCGAAC-3')

259r (reverse) следующей последовательности

(5'-TTTCACGAACAACGCGACAA-3')

Для амплификации ITS 1 рДНК использовались следующие праймеры:

EC16S (forward) **(5' -TTGTACACACCGCCCGT-CA-3')**

Mb23S (reverse) **(5'- TCTCGATGCCAAGG-CATCCACC-3')**(Roth et al., 1998).

Затем 10 мкл реакционной смеси, содержащей 66 mM Tris–HCl (pH 9.0), 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 U фосфатазы арктических креветок (shrimp alkaline phosphatase (SAP)) (Promega, США), и 5 U Экзонуклеазы I (Fermentas, EU), было добавлено к каждому ПЦР продукту и полученная смесь инкубировалась при 37 °C 30 минут для дефосфорилирования 5'-концевых фосфатных групп дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и элиминации праймеров.

В конце реакции фермент был деактивирован нагреванием при 85°C в течение 10 минут.

Секвенирование было проведено с использованием набора ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit и секвенатора ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США; Hitachi, Япония)

Выравнивание отсеквенированных последовательностей было проведено с помощью программного обеспечения Vector NTI Suite 9 (Infomax Inc, США). Для видовой идентификации отсеквенированные последовательности были сравнены с последовательностями, загруженными в the GenBank NCBI, RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (<http://rdna.ridom.de/>)) и дополнительно проверены работами Roth и др. (1998).

Сполиготипирование с помощью гибридизации

Сполиготипирование было проведено как описал Kamerbeek и др. (1997) с коммерческим набором (Isogen Bioscience BV, Maarssen, Нидерланды). Результаты были зафиксированы в виле

двоичного кода согласно результатам гибридизации каждого спейсера нуклеотидного зонда и внесены в таблицу Excel.

Сполиготипирование с помощью MALDI-ToF MS

Аmplификация DR области была осуществлена с помощью праймеров, описанных выше (Kamerbeek et al., 1997). Дефосфорилирование 5'- концевых фосфатных групп дезоксинуклеозидтрифосфатов и элиминация праймеров были проведены как описывается выше. Внутренние праймеры для анализа области прямых повторов были разработаны с помощью ПО Oligo primer analysis (version 6.31, Molecular Biology Insights, Inc.)

Реакция удлинения праймеров была проведена в смеси, содержащей 66 mM Tris-HCl (pH 9.0), 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 mM MgCl_2 and 2 U TermiPol ДНК-полимераза (Solis Biodyne, Estonia), 20 pmol олигонуклеотидных праймеров, 2 mM определенных дидезоксинуклеотид трифосфатов (ddNTP), которые необходимы для реакции. Реакция включала следующие температурные циклы: 2 минуты при 94°C, 70 циклов по 20 секунд при 94°C, 20 секунд при 60°C и 15 секунд при 72°C

0,2 мкл образца было нанесено на ячейку MALDI мишени с предварительно нанесенным на нее раствором матрицы. Матрица: 3-гидроксипиколиновая кислота (Fluka, Германия) разведенная в растворе ацетонитрил/вода в соотношении 1:1, смешанная с 0,4M двухосновным цитратом аммония (Fluka, Германия) в соотношении 9:1. Матрица была предварительно высушена на Anchor чипе (Bruker Daltonics, Германия).

Масс-спектры удлиненных в ходе реакции зондов были сняты с помощью масс-спектрометра Autoflex (Bruker Daltonics, Германия). Регистрация и анализ полученных масс-спектров производились с помощью программного обеспечения FlexControl и FlexAnalysis v.2.4 (Bruker Daltonics, Германия)

Результаты

В итоге 67 клинических образцов были проанализированы с помощью метода прямого белкового профилирования. Эта группа была представлена 16 видами NTM (*M. abscessus*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. diernhoferi*, *M. fortuitum*, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. neoaurum*, *M. peregrinum*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*) и двумя видами NTBC (*M. tuberculosis*, *M. bovis*). Для каждого штамма, принадлежащего этой группе, корректность видовой идентификации была подтверждена набором GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Германия), секвенированием гена 16S РНК и секвенированием ITS.

В случае с микобактериями начальный протокол измерений, который ранее успешно использовался нашей рабочей группой при исследовании *Neisseria* spp (Ильина и др, 2009), *N. ruori* (Ильина и др, 2010) и бактерий-неферментеров (Mellmann и др, 2009), в данном случае не срабатывал. Предположительно, причина была в стабильности клеточной стенки микобактерий из-за миколовой кислоты, которая предполагает более агрессивные факторы для ее разрушения.

Часть исследования была посвящена оптимизации процедуры пробоподготовки с целью увеличения эффективности экстракции белковых молекул из бактериальной клетки. На каждом этапе проводилось более интенсивное и долгое пипетирование. Такж

различных способа деградации микробной клетки. В первом случае клетка суспендировалась в сверхчистой воде в течение 20 минут при комнатной температуре при тщательном перемешивании. Во втором случае суспензия нагревалась до 96°C в течение такого же периода времени. Необходимо заметить, что качество спектров значительно снижалось, в случае, если использовалось нагревание (см.рис.1)

E. Shitikov et al. / Infection, Genetics and Evolution xxx (2012) xxx-xxx

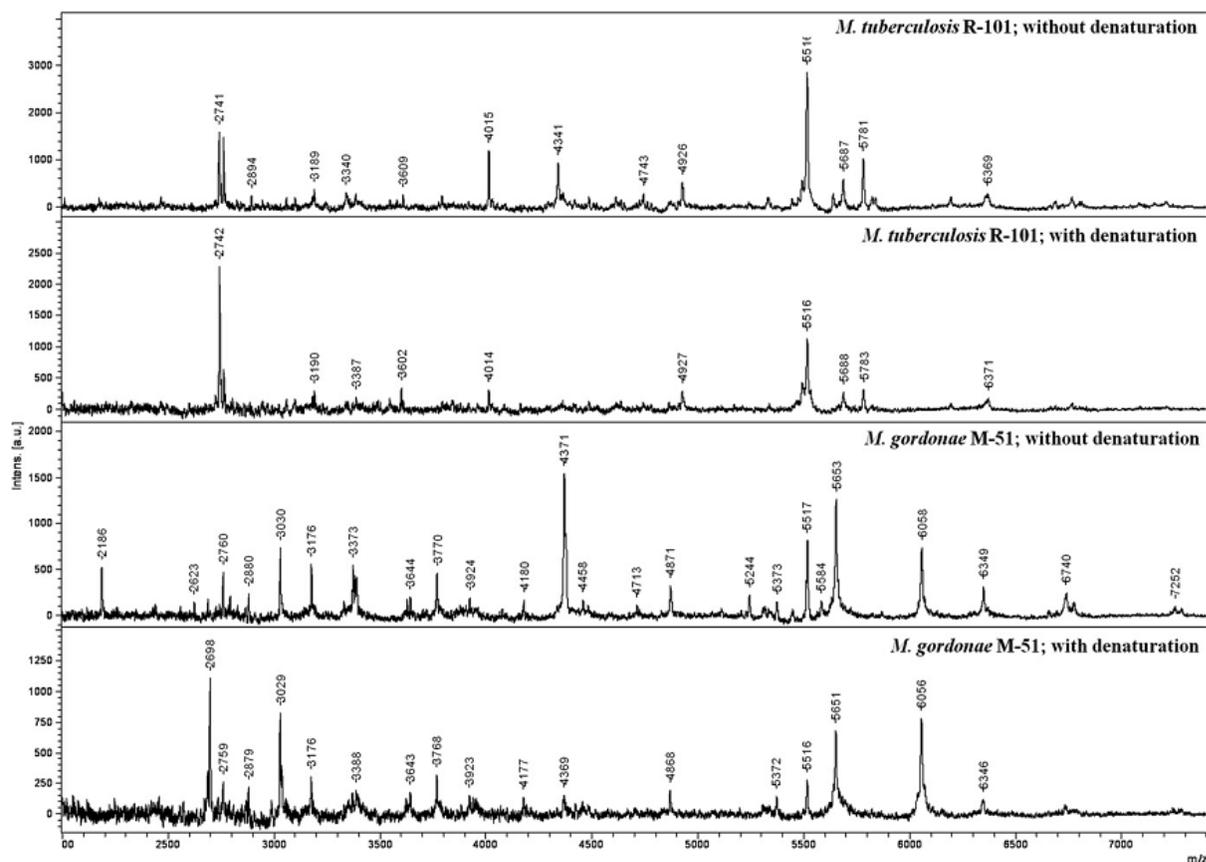


Рис.1 Сравнение спектров, полученных от *M. tuberculosis* и *M. gordonae* с использованием различных способов деградации клетки

В случае некоторых видов, например, *M. scrofulaceum*, качество масс-спектров, если судить по таким параметрам, как соотношение сигнал/шум, интенсивность пиков, кол-во пиков и их разрешение, менялось от ячейки к ячейке, что приводило к снижению кол-ва снятых спектров.

Когда наиболее подходящий метод белковой экстракции был отработан, мы смогли получать воспроизводимые и хорошо разрешенные спектры. В конце концов стало возможным проведение автоматического снятия и накопления данных.

Тридцать спектров (5 ячеек, по 6 точек на каждой) были сняты для каждой пробы. Сравнение спектров, снятых с разных видов микобактерий выявило значительную разницу в положении пиков в спектре разных видов.

Для дальнейшего кластерного анализа использовалась программ Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, Германия). Для каждого образца программой был создан главный спектр (MSP), сконструированный за счет сравнительного анализа 30 первоначальн

кластерный анализ разделил все MSP на две различные крупные группы, соответствующие MTBC и NTM образцам, и также продемонстрировал возможность изолированной видовой идентификации. Необходимо отметить, что незначительные отличия наблюдались внутри группы MTBC между *M. bovis* и *M. tuberculosis*.

Затем наиболее предпочтительные спектры были отобраны для внесения в библиотеку спектров MALDI Biotyper, а единичные спектры были заново сравнены с внесенными в библиотеку спектрами. В результате, мы могли безошибочно идентифицировать спектры внутри NTM группы, кроме *M. bovis* и *M. tuberculosis*, которые незначительно отличались друг от друга.

Отдельная группа *M. tuberculosis* была использована для разработки и валидации протокола сполитипирования с помощью масс-спектрометрии. Мы совместили реакцию протяжки праймеров с последующим MS анализом для быстрого определения структуры DR области. Были разработаны восемь мультиплексных систем на базе всех 43 спейсерных последовательностей в информативной DR области MTBC. Праймеры для протяжки были созданы и скомпонованы в мультиплексную систему для возможности кросс-гибридизации. После присоединения к целевой области праймеры протягивались на одну пару нуклеотидов. В то же время, в каждую реакционную смесь добавлялся только один ddNTP, чтобы предотвратить возможность не специфического отжига.

Системы были созданы таким образом, что не удлиненные олигонуклеотиды и продукты реакции, для которых протяжка произошла, на масс-спектре имели свои уникальные отличные друг от друга массы. Схематическая изображение реакции протяжки праймеров и масс-спектров полученных продуктов, представлена на схеме 1. Как видно, протяжка цепи происходит только в том случае, если спейсер и ddATP, появляются в реакционной смеси. Другие спейсеры локуса были детектированы похожим образом.

Reaction mixture: ddA		Masses of probes extended on the spacers (+ddNTP)
Spacer 1	primer Sp_1 (5605 Da) gggtctgacgac <u>ACGACTAGGGGAGCGTGATCCAGAGCCGGCGACCCTCTATG</u> gtttccgtcc	5902
Spacer 2	primer Sp_2 (5823 Da) gggtctgacgac <u>TTGGTCAAAGCTGTCGCCCAAGCATGAGGCA</u> AAAgtttccgtcc	6120
Spacer 3	primer Sp_3 (6035 Da) gggtctgacgac <u>TAGAAGGCGATCACTGGAAGCACGGCGCTTGCGA</u> gtttccgtcc	6332
Spacer 4	primer Sp_4 (6494 Da) gggtctgacgac <u>CTGATGATTGGTCGGCGTATGACGTGCTACTGAGGTGT</u> gtttccgtcc	6791
Spacer 5	primer Sp_5 (6416 Da) gggtctgacgac <u>CTAAGCCCGCTAATCCCGCACAGTGGTCAG</u> AAAgtttccgtcc	6713
Spacer 6	primer Sp_6 (6669 Da) gggtctgacgac <u>AGGCTGAAATTGAAGCCGGAATGACGACGCATTGGT</u> gtttccgtcc	6966

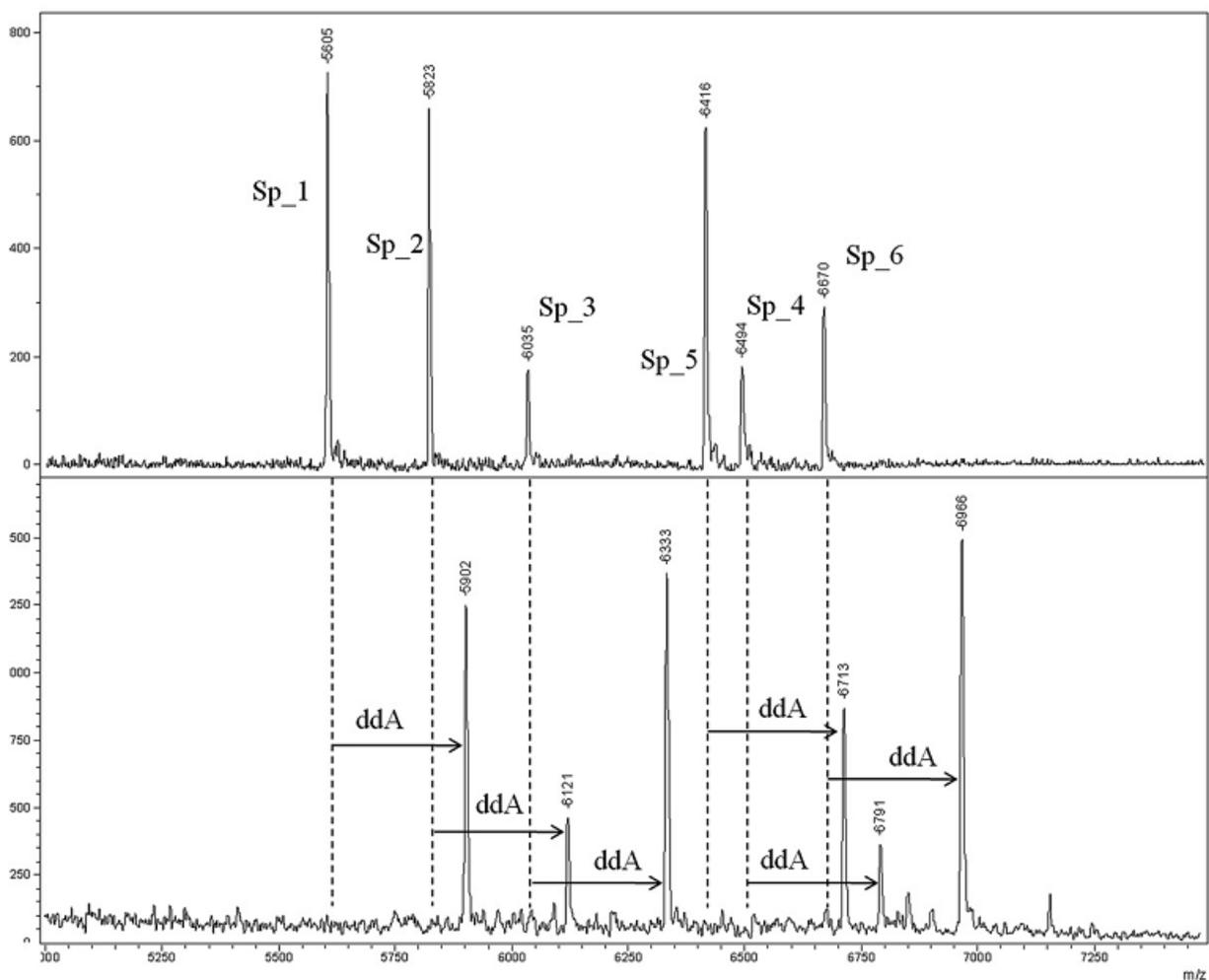


Схема1: Схематическое отображение реакции протяжки праймеров..Отображены масс-спектры изначальных зондов и продуктов реакции. На картинке видно, что все исходные зонды протянулись на ddA, что свидетельствует о присутствии спейсеров в анализируемом локусе

Вся группа штаммов *M.tuberculosis* была проанализирована классическим методом сполиготипирования и с помощью нового протокола на основе масс-спектрометрии. Наиболее доминирующими найденными нами генотипами были генотипы следующих штаммов: Beijing (74,9%), LAM 9 (8,2%), T1 (3,5%), Haarlem3 (2,6%), T4 (2,4%), T1RUS-2 (1,7%). Мы также получили 14 дополнительных сполиготипов, но частота встречаемости каждого из них была менее 1%. результаты, полученные при использовании протокола сполиготипирования с масс-спектрометрией полностью совпали с результатами, приведенными выше (таблица2).

Spoligotype	No. of isolates with spoligotype according to:	
	Spoligotyping protocol based on mass spectrometry	Reverse line blot hybridization
Beijing	256	256
LAM9	28	28
T1	12	12
Haarlem3	9	9
T4	8	8
T1_RUS2	5	5
Unknown	3	3
Family33	2	2
Haarlem4	2	2
LAM9 (252)	2	2
T1 0.22 Haarlem3 0.77	2	2
T4, H37Rv	2	2
T5_RUS1	2	2
Family36	1	1
Haarlem1	1	1
Haarlem2	1	1
LAM3_S (conver)	1	1
LAM9 (42)	1	1
T2	1	1
T2 (U (likely H3))	1	1
T2-T3	1	1
U	1	1

Таблица 2: Результаты сполиготипирования для 342 образцов ДНК *M. Tuberculosis*, полученных с использованием масс-спектрометрии и обратной блот гибридизации.

Обсуждение

MALDI – TOF MS аналитический инструмент с большим кол-вом возможностей в измерении различных биомолекул, таких как: белки, жиры, нуклеиновые кислоты. Используя это оборудование можно проводить исследования в различных областях науки.

Преимущества MALDI-TOF MS могут быть использованы для быстрой идентификации бактерий, основанной на исследовании микса клеточных компонентов, преимущественно белков и протеинов, также как и на исследовании «цельной» клетки. В этой работе мы использовали технологию на основе масс-спектрометрии для видовой идентификации близкородственных микроорганизмов рода *Mycobacterium*.

В этой работе мы в основном использовали клинические изоляты *Mycobacterium* spp вместо референсных штаммов. Это не только привело нас к изучению разнообразия этих бактериальных патогенов, но и к использованию дополнительных методов более точной видовой идентификации каждого образца.

Необходимо отметить, что существует только четыре публикации, описывающие стратегию MALDI TOF идентификации микобактерий. Pignone и др (2006) был первым, кто доложил, что было получено 37 уникальных спектров ATCC штаммов микобактерий, представляющих 13 видов рода *Mycobacteria*. Согласно их протоколу измерений, диапазон исследуемых масс был выбран от 500 до 4000 Da, и большинство детектируемых пиков было массой ниже 1000 Da. Другое исследование, опубликованное некоторое время спустя, было также произведено на ATCC

штаммах, среди которых были представители четырех видов микобактерий: *M.tuberculosis*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.kansasii* (Hettick и др, 2006). авторы этого исследования также сообщали о возможности видовой идентификации микобактерий с помощью MALDI TOF MS. Также они описали возможность корректной дифференциации туберкулезных штаммов от нетуберкулезных со 100% точностью для патогенных микроорганизмов, что позволяло достоверно отличить их от их менее опасных сородичей. Когда главные спектры (MSP) NTM были добавлены в библиотеку MALDI Biotyper, возможность достоверной идентификации была получена для каждого штамма.

Если брать в рассмотрение членов группы MTBC, то на основе рассмотрения их масс-спектра, можно выделить три отдельные группы. Одна группа сформирована штаммами *M.bovis*, две другие *M. tuberculosis*. Несмотря на то, что мы отметили дивергенцию между штаммами *M. tuberculosis* и анализ масс-спектров показал небольшие различия, мы были не в состоянии установить их origin на данном этапе. К сожалению, когда мы добавили наиболее предпочтительный спектр в библиотеку MALDI Biotyper, мы не смогли осуществлять дискриминацию видов внутри группы MTBC при помощи стандартной процедуры идентификации, даже несмотря на найденные небольшие различия в спектрах. Это проблема будет решена в будущем, при помощи более детального анализа спектров.

В то же время, такой подход, требующий небольшого кол-ва биологического материала, с очень простой пробоподготовкой позволяет проводить высокоточную дифференциацию MTBC от NTP, и также видовую идентификацию внутри NTP группы. Сравнительная цена этой методики значительно ниже цены наиболее распространенных методик данного плана.

Чтобы продемонстрировать потенциал масс-спектрометрии для идентификации микобактерий на уровне штамма, мы приспособили эту платформу для сполиготипирования. Метод сполиготипирования является довольно успешным инструментом для быстрой обработки результатов генотипирования MTBC и для установления глобальной картины diversion MTBC.

В нашей работе мы представляем протокол, который включает реакцию ПЦР с последующими мультиплексными реакциями протяжки праймера и измерением с помощью MALDI TOF MS. В данном обзоре мы описываем создание нашей новой схемы сполиготипирования, комбинированной с прямым бактериальным профилированием. Мы увеличили кол-во реакций протяжки праймера, таким образом, уменьшили сложность единичной реакции, чтобы упростить процесс пробоподготовки в рутинной практике. 3-5 -плексные реакции могут ставиться в рутинных условиях в параллели.

Мы оптимизировали протокол на основе масс-спектрометрии и использовали его для рутинного типирования штаммов *M.tuberculosis*. Кол-во сполиготипов, в данном случае может быть посчитано в таблице Excel.

Использование протокола сполиготипирования с применением масс-спектрометрии позволяет проводить анализ 48 образцов в течение 8 часов. Для сравнения, анализ 45 образцов в оптимальных условиях с использованием reverse line blot гибридизации занимает более 24 часов. Кроме того, MALDI TOF является абсолютно открытой системой и возможно ее совместное использование с другими системами и наборами.

На основе описанных экспериментов, мы можем заключить, что технология прямого бактериального профилирования очень хорошо подходит для внутригрупповой идентификации

микобактерий. Кроме того, в случае *M. tuberculosis* другая методика, основанная на MALDI TOF MS, подходит для сполиготипирования. Проиллюстрированная возможность использования одного и того же устройства для идентификации и типирования *M.tuberculosis* показывает многофункциональность и универсальность представленных решений, как полезного инструмента для целей молекулярной эпидемиологии.