

Оценка MALDI-TOF масс-спектрометрической системы Andromas для идентификации растущих в аэробных условиях грамположительных палочек

E. Farfour,^{a,b} J. Leto,^f M. Barritault,^{a,b} C. Barberis,^g J. Meyer,^a B. Dauphin,^f A.-S. Le Guern,^h A. Lefliche,ⁱ E. Badell,^j N. Guiso,^j A. Leclercq,^k A. Le Monnier,^k M. Lecuit,^{a,k} V. Rodriguez-Nava,^l E. Bergeron,^l J. Raymond,^{a,c} S. Vimont,^d E. Bille,^{a,b} E. Carbonnelle,^{a,e} H. Guet-Revillet,^{a,b} H. Lécuyer,^{a,b} J.-L. Beretti,^{a,b} C. Vay,^g P. Berche,^{a,b} A. Ferroni,^{a,b} X. Nassif,^{a,b} and O. Join-Lambert^{a,b}

Université Paris Descartes, Paris, France^a; Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Necker-Enfants Malades,^b Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Cochin,^c Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Tenon,^d and Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou,^e Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; Andromas SAS, Pépinière Paris Santé Cochin, Paris, France^f; Laboratorio de Bacteriologia, Hospital de Clínicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina^g; Laboratoire du Centre Médical de l'Institut Pasteur,^h Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence,ⁱ Molecular Prevention and Therapy of Human Diseases, National Centre of Reference of Corynebacteria of the *Diphtheriae* Complex,^j and Centre National de Référence des *Listeria*, Institut Pasteur, Paris, France^k; and Research Group on Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment, UMR5557-Observatoire Français des Nocardioses, Université Claude Bernard Lyon¹, Lyon, France^l

Времяпролётная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией-ионизацией (MALDI-TOF MS) – быстрый и простой метод идентификации микроорганизмов. В прежних публикациях, в которых использовалась система Biotyper, говорилось о том, что эта технология требует предварительной экстракции для идентификации грамположительных палочек (ГПП). Такая техническая проблема способна ограничить на практике использование этой технологии для идентификации ГПП в клинических условиях. Мы оценили точность при использовании стратегии MALDI-TOF MS Andromas для идентификации 659 изолятов ГПП, представляющих 16 бактериальных родов и 72 вида, используя метод прямого нанесения колоний. Собранная коллекция бактерий включала 40 изолятов *C. diphtheriae*, 13 *C. pseudotuberculosis*, 19 *C. ulcerans*, и 270 других изолятов *Corynebacterium*, 32 *L. monocytogenes* и 24 других изолята *Listeria*, 46 *Nocardia*, 75 *Actinomyces*, 18 *Actinobaculum*, 11 *Propionibacterium acnes*, 18 *Propionibacterium avidum*, 30 *Lactobacillus*, 21 *Bacillus*, 2 *Rhodococcus equi*, 2 *Erysipelothrix rhusiopathiae*, а также 38 других изолятов ГПП. Все изоляты были идентифицированы с помощью референтных технологий. В целом 98,5% и 1,2% изолятов не-листерий идентифицированы соответственно до вида или рода. За исключением изолятов *L. grayi*, идентифицированных до вида, другие изоляты *Listeria* определены до рода из-за очень близких спектров. Полученные данные демонстрируют, что быстрой идентификации патогенных ГПП можно достичь методом MALDI-TOF MS, не прибегая к экстракции.

Растущие в аэробных условиях грамположительные палочки (ГПП) представляют гетерогенную и обширную группу бактериальных видов (23). Некоторые из них, как например: *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*, и *Bacillus anthracis* - являются высокопатогенными. Эти виды бактерий, связанные с тяжелыми внебольничными инфекциями, могут быть сопряжены со вспышками, что требует быстрой идентификации как для терапевтического, так и для инфекционного контроля. Другие клинически важные патогенные виды ГПП включают *Nocardia* spp. и *Rhodococcus equi*, способные вызывать тяжелые оппортунистические инфекции. *Corynebacterium urealyticum* и *Corynebacterium jeikeium* связаны соответственно с инфекциями мочевыводящих путей и с катетер-ассоциированными инфекциями, протезным эндокардитом и септициемией и могут оказаться мультирезистентными (31, 49). Наконец, в течение последних двух десятилетий ряд видов с низкой патогенностью, такие как *Propionibacterium acnes* и новые актиномицеты (*Actinobaculum schaalii*, *Actinomyces neuii*, *Actinomyces turicensis* и *Actinomyces radingae*), оказались связаны с различными инфекционными заболеваниями (5, 25, 37). Поэтому быстрая идентификация ГПП все чаще требуется для решения терапевтических и/или эпидемиологических задач.

Систематическая идентификация ГПП является проблемной. Методы идентификации по фенотипическим свойствам надёжны для идентификации патогенных ГПП. Однако большинство изолятов комменсалов ГПП, наиболее часто культивируемых в микробиологических лабораториях с помощью данных методов, нелегко идентифицировать из-за низкой или меняющейся реакционной способности или из-за необходимости проведения дополнительных тестов, требующихся вплоть до 50% случаев, чтобы получить 90% уровень верной идентификации (22). Кроме того, поскольку многие недавно описанные виды ГПП были охарактеризованы с помощью молекулярных методов, таких как секвенирование гена 16S рРНК, эти виды невозможно идентифицировать по фенотипическим характеристикам при отсутствии соответствующих идентификационных систем или обновлённых баз данных (1, 10, 21, 22, 45, 54). В ряде случаев секвенирование гена 16S рРНК недостаточно для распознавания близкородственных видов, и для этой цели были разработаны альтернативные молекулярные методы (28, 36, 38). Времяпролётная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией-ионизацией (MALDI-TOF MS) является технологией быстрой бактериальной идентификации, всё чаще применяемой микробиологическими лабораториями (13, 30, 48). Действие систем идентификации MALDI-TOF MS основано на сравнении белкового масс-спектра исследуемого изолята с референтными базами данных. Разработаны несколько баз данных и стратегий идентификации, включая системы Biotyper (Bruker Daltonics, Бремен, Германия), Saramis (bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, Франция), и Andromas (Париж, Франция). В прежних исследованиях сообщалось, что MALDI-TOF MS система Bruker безошибочно идентифицирует виды ГПП, такие как *Listeria* spp., *Nocardia* spp. и *Corynebacterium* (3, 6, 29, 51). В этих исследованиях обязательным было проведение предварительной экстракции для получения удовлетворительных результатов, процедуры громоздкой и трудоёмкой в отличие от метода прямого нанесения колоний, который можно использовать для идентификации грамотрицательных палочек (43). Доступные MALDI-TOF MS базы данных были также апробированы в клинических микробиологических лабораториях, но эти базы включали лишь несколько ГПП, а в некоторых случаях сообщалось о неудовлетворительных результатах идентификации (7, 47).

Стратегия идентификации Andromas основана на ограниченном количестве видовых профилей каждой записи данных (11, 16). Особенностью базы данных Andromas является то, что она создана при прямом нанесении колоний без стадии экстракции (7, 12). Предыдущие исследования показали, что эта стратегия идентификации обеспечивает хорошую идентификацию бактерий, микобактерий, дрожжей и *Aspergillus* spp. с помощью метода прямого нанесения (2, 7, 11, 16, 18, 19, 32). Мы оценили точность этого метода для идентификации большой коллекции изолятов ГПП, включающей изоляты как патогенов, так и комменсалов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные изоляты. Для проведения этого исследования была создана коллекция из 659 изолятов, происходящих из клинических микробиологических лабораторий Франции и референтных центров и из клинической микробиологической лаборатории Университета Буэнос-Айреса, Аргентина. В целом, эта коллекция состоит из 16 бактериальных родов и 73 видов бактерий, перечисленных в таблице 1. За исключением изолятов *Listeria*, *Nocardia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, и *Corynebacterium ulcerans*, мы использовали секвенирование гена 16S рРНК в качестве референтного метода для идентификации клинических изолятов. Секвенсы гена 16S рРНК сравнивали с бактериальными штаммами, полученными в GenBank или в Биоинформационной базе данных бактериальной идентификации (Bioinformatic Bacterial Identification database) (17). Для окончательной идентификации был необходим порог сходства $\geq 99.0\%$.

Изоляты *Listeria* были идентифицированы во Французском национальном референтном центре по *Listeria* с помощью системы идентификации листерий API Listeria (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Франция) (8, 20, 34) и дополнительных фенотипических подтверждающих тестов (41, 46). Все изоляты *Nocardia* идентифицированы во Французском референтном центре по *Nocardia*,

используя многофазный подход, включая морфологическое исследование, биохимическое профилирование, тестирование на чувствительность к антимикробным препаратам и секвенирование гена 16S рРНК с помощью специфических праймеров, разработанных для идентификации *Nocardia* spp. (42). Частичное секвенирование гена *hsp65* было проведено только для изолятов, идентифицированных как *Nocardia abscessus*, *Nocardia arthritidis*, и *Nocardia beijingensis* для подтверждения видовой идентификации (42). Изоляты *Corynebacteria diphtheriae*, *C. ulcerans*, и *C. pseudotuberculosis* были идентифицированы во Французском национальном центре по *Corynebacteria* дифтерийного комплекса, используя систему API Coryne (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Франция), дополнительные фенотипические исследования и специфичные молекулярные методы (ПЦР, специфичную к гену *dtxR* *C. diphtheriae*, и мультиплексную ПЦР, специфичную к генам 16S рРНК, *groB* и *pld* *C. pseudotuberculosis* и *C. ulcerans*) (36, 38).

Оборудование и анализ результатов. Бактериальные изоляты выращивали на Columbia agar с добавлением 5% лошадиной крови в течение 24 часов (48 часов для медленно растущих бактерий) при 37°C в атмосфере 10% CO₂. Цельноклеточные бактерии помещали на плашку-мишень MALDI-TOF MS без проведения этапа экстракции с помощью хлопкового тампона и высушивали при комнатной температуре. Затем образцы фиксировали добавлением 1 мкл абсолютного этанола для инактивации бактерий и вновь высушивали при комнатной температуре. Поверх образцов наслаивали 1 мкл α -циано-4-гидроксикоричной кислоты и оставляли кристаллизоваться при комнатной температуре. Масс-спектры образцов снимали на MALDI-TOF MS спектрометре Microflex при помощи программного обеспечения FlexControl (Bruker Daltonics, Бремен, Германия). Положительные ионы получали при ускоряющем напряжении 20 кВ в линейном диапазоне. Каждый спектр представлял сумму ионов, полученных от 350 лазерных ударов, проведённых автоматически по разным участкам одной ячейки. Спектры анализировали в диапазоне *m/z* от 3,500 до 20,000.

Оценка MALDI-TOF MS системы Andromas для идентификации ГПП. Бактериальные изоляты идентифицировали с помощью программного обеспечения Andromas, будучи неосведомлёнными о результатах идентификации референтным методом. Эта программа сравнивает масс-спектр проверяемого изолята со спектрами в базе данных Andromas, принимая во внимание возможное отклонение пика масс на ± 10 *m/z* (7). База данных Andromas была создана на основе и референтных, и клинических изолятов, получаемых в нашей лаборатории в повседневной практике. Сегодня она насчитывает более 700 видов бактерий, включая 33 рода и 156 видов, растущих в аэробных условиях Грамположительных палочек. Используя это программное обеспечение, идентификацию считали состоявшейся, если % пиков был $\geq 68\%$ от количества видоспецифичных пиков спектра в базе данных. Требование 10% различия в коэффициентах достоверности между первыми двумя идентифицированными видами по базе данных также было необходимо для идентификации до вида. Если последнее условие не выполнялось, идентификацию считали верной до уровня рода или группы для близкородственных видов при условии, что оба первых вида относятся к одному роду или группе бактерий. Во всех остальных случаях идентификацию считали несостоявшейся.

В этом исследовании идентификацию считали ошибочной при расхождении результатов идентификации, полученных методом MALDI-TOF MS и методом секвенирования гена 16S рРНК или другими референтными методами идентификации, перечисленными выше. Идентификацию до рода или отсутствие идентификации не считали ошибочной идентификацией.

Распознавание видов *Listeria*. Исследование сходства масс-спектров изолятов *Listeria*, представленных в виде геля, и оценка дендрограмм были выполнены с помощью программного обеспечения BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Бельгия). Сходство масс-спектров оценивали используя евклидово расстояние. Иерархическую кластеризацию проводили используя невзвешенный метод средней связи (UPGMA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

За исключением изолятов *Listeria*, 98,5% (594/603) штаммов идентифицированы до вида, и только 1,2% (7/603) идентифицированы до рода (Таблица 1). Правильная идентификация получена для близкородственных патогенных видов *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, и *C. pseudotuberculosis*, так же как и для часто встречающихся нелипфильных комменсальных видов *Corynebacterium*, которые трудно идентифицировать с помощью биохимических тестов: *C. striatum* или *C. amycolatum*, которые ошибочно идентифицируются как *C. xerosis* (21); *C. simulans*, чей биохимический профиль схож с *C. striatum* или *C. minutissimum* (53), и *C. aurimucosum*, которую трудно отличить от *C. minutissimum* (55). MALDI-TOF MS позволяет также быстро идентифицировать бактериальные виды, требующие применения молекулярных методов для окончательной идентификации, как *Nocardia* spp., *Rhodococcus equi*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Actinomyces* spp., и *Bacillus* и *Lactobacillus* spp. (9). В большинстве случаев MALDI-TOF MS демонстрировала результаты идентификации изолятов ГПП так же успешно, как и расширенные фенотипические и специфические молекулярные методы.

Наоборот, за исключением изолятов *Listeria grayi*, идентифицированных до вида, все остальные изоляты *Listeria* были идентифицированы до рода. Действительно, масс-спектры этих изолятов всегда совпадали более, чем с одним видовым профилем *Listeria* в базе данных с высоким значением сходства ($\geq 68\%$ общих пиков). Более того, 10% различия между первыми двумя лучшими совпадениями, которые обязательны в алгоритме Andromas для видовой идентификации, не достигались. Поэтому идентификация была представлена лишь до рода. Анализ сходства масс-спектров изолятов *Listeria* объясняет эти результаты, показывая, что изоляты *Listeria grayi* и не-*grayi* образуют два разных кластера с высокими значениями внутреннего сходства ($\geq 70\%$), но у этих двух кластеров доля сходства только 40% (Рис.1). Эти выводы подтверждают результаты филогенетических исследований 16S и 23S рПНК, продемонстрировавших идентификацию двух кластеров в пределах этого рода: одного *L. grayi* и другого, объединяющего все остальные виды листерий (14, 44).

Только 7 других ГПП были идентифицированы до рода, включая 4 изолята *Nocardia*, 2 изолята *C. aurimucosum* и 1 изолят *A. viscosus*. 4 изолята *Nocardia*, относящихся к разным видам, не удалось идентифицировать из-за некачественных спектров, по технической проблеме, о которой сообщалось ранее – о *Nocardia* без проведения экстракции (51). Два изолята *C. aurimucosum* и *A. viscosus* имели удовлетворительные масс-спектры, но совпадающие с другими видоспецифичными профилями того же рода менее, чем с 10% различием.

Наконец, изолят *C. aurimucosum* был ошибочно идентифицирован как *C. striatum*, и 1 изолят *C. diphtheriae* не удалось идентифицировать. Анализ масс-спектра изолята *C. aurimucosum* показал, что он соответствует новому профилю, специфичному *C. aurimucosum*. Изолят *C. diphtheriae* не был идентифицирован, так как его масс-спектр содержал лишь 5 пиков, тогда как видоспецифичные профили близкородственных видов *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*, и *C. ulcerans* содержат минимум 23 пика. В этом случае белковая экстракция муравьиной кислотой несколько улучшала масс-спектрометрический профиль (13 пиков), но видовую идентификацию получить не удалось, поскольку первые два лучших совпадения по базе данных оказались слишком близкими (*C. diphtheriae* на 63% и *C. pseudotuberculosis* на 60%). Этот нетоксигенный изолят был получен от пациента с бактериемией. Он хорошо рос на чашках с агаром и был правильно идентифицирован фенотипическими и молекулярными методами.

Все изоляты *Bacillus cereus* идентифицированы как группа *Bacillus cereus/B. thurigiensis* поскольку эти два вида демонстрируют сходные видоспецифичные спектры в базе данных Andromas. Четыре дополнительных изолята *Bacillus* идентифицированы как *B. pumilus/B. safensis* по той же причине и так как они не могут быть идентифицированы до вида секвенированием гена 16S рПНК.

Таблица 1.

Идентификация 659 грамположительных палочек с помощью системы MALDI-TOF MS Andromas^aTABLE 1 Identification of 659 Gram-positive rods using the MALDI-TOF MS Andromas system^a

Genus or species	No. of isolates tested	Identification result (no. of isolates)			
		Species level	Genus level	Not identified	Error
<i>Actinobaculum</i> spp. ^b	18	18	0	0	0
<i>A. schaalii</i>	14	14	0	0	0
<i>A. massiliense</i>	4	4	0	0	0
<i>Actinomyces</i> spp. ^b	76	75	1	0	0
<i>A. europaeus</i>	1	1	0	0	0
<i>A. funkei</i>	4	4	0	0	0
<i>A. naeshlundii</i>	1	1	0	0	0
<i>A. neuii</i>		33	33	0	0
<i>A. odontolyticus</i>	5	5	0	0	0
<i>A. radingae</i>	6	6	0	0	0
<i>A. turicensis</i>	23	23	0	0	0
<i>A. urogenitalis</i>	2	2	0	0	0
<i>A. viscosus</i>	1	0	1	0	0
<i>Bacillus</i> spp. ^b	21	21	0	0	0
<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i>	10	10	0	0	0
<i>B. licheniformis</i>	2	2	0	0	0
<i>B. pumilus</i> / <i>B. safensis</i>	4	4	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	3	3	0	0	0
<i>B. simplex</i>	2	2	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> spp. ^b	342	338	2	1	1
<i>C. amycolatum</i>	97	97	0	0	0
<i>C. aurimucosum</i>	30	27	2	0	1
<i>C. coyleae</i>	3	3	0	0	0
<i>C. diphtheriae</i>	40	39	0	1	0
<i>C. glucuronolyticum</i>	10	10	0	0	0
<i>C. imitans</i>	2	2	0	0	0
<i>C. jeikeium</i>	16	16	0	0	0
<i>C. massiliensis</i>	1	1	0	0	0
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	10	10	0	0	0
<i>C. pseudotuberculosis</i>	13	13	0	0	0
<i>C. simulans</i>	25	25	0	0	0
<i>C. singulare</i>	1	1	0	0	0
<i>C. striatum</i>	44	44	0	0	0
<i>C. tuberculostearicum</i>	18	18	0	0	0
<i>C. ulcerans</i>	19	19	0	0	0
<i>C. urealyticum</i>	10	10	0	0	0
<i>Lactobacillus</i> spp. ^b	30	30	0	0	0
<i>L. casei</i>		1	1	0	0
<i>L. crispatus</i>	8	8	0	0	0
<i>L. delbrueckii</i>	1	1	0	0	0
<i>L. fermentum</i>	2	2	0	0	0
<i>L. gasserii</i>	7	7	0	0	0
<i>L. jensenii</i>	6	6	0	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	5	5	0	0	0
<i>Listeria</i> spp. ^b	56	4	52	0	0
<i>L. grayi</i>		4	4	0	0
<i>L. innocua</i>	5	0	5	0	0
<i>L. ivanovii</i>	5	0	5	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	32	0	32	0	0
<i>L. seeligeri</i>	5	0	5	0	0
<i>L. welshimeri</i>	5	0	5	0	0

TABLE 1 (Continued)

Genus or species	No. of isolates tested	Identification result (no. of isolates)			
		Species level	Genus level	Not identified	Error
<i>Nocardia</i> spp. ^b	46	42	4	0	0
<i>N. abscessus</i>	4	4	0	0	0
<i>N. asteroides</i>	2	2	0	0	0
<i>N. arthritidis</i>	1	0	1	0	0
<i>N. beijingensis</i>	3	3	0	0	0
<i>N. brasiliensis</i>	7	6	1	0	0
<i>N. cyriacigeorgica</i>	7	6	1	0	0
<i>N. farcinica</i>	11	10	1	0	0
<i>N. nova</i>		5	5	0	0
<i>N. mexicana</i>	1	1	0	0	0
<i>N. otitidis</i> / <i>cavium</i>	2	2	0	0	0
<i>N. paucivorans</i>	1	1	0	0	0
<i>N. veterana</i>	2	2	0	0	0
<i>Propionibacterium</i> spp. ^b	29	29	0	0	0
<i>P. acnes</i>	11	11	0	0	0
<i>P. avidum</i>	18	18	0	0	0
Other GPR species ^c	41	41	0	0	0
<i>Arthrobacter cummingsii</i>	1	1	0	0	0
<i>Brevibacterium casei</i>	3	3	0	0	0
<i>Brevibacterium paucivorans</i>	1	1	0	0	0
<i>Dermabacter hominis</i>	12	12	0	0	0
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	2	2	0	0	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	3	3	0	0	0
<i>Paenibacillus motobuensis</i>	1	1	0	0	0
<i>Rhodococcus equi</i>	2	2	0	0	0
<i>Turicella otitidis</i>	16	16	0	0	0

a Масс-спектры исследованных изолятов сравнивали с полной базой Andromas, которая охватывает более 700 видов бактерий, включая 33 рода и 156 видов растущих в аэробных условиях грамположительных палочек (ГПП).

b Для этих родов общее количество таксонов в базе данных Andromas: 18 *Actinomyces*, 3 *Actinobaculum*, 13 *Bacillus*, 32 *Corynebacterium*, 24 *Lactobacillus*, 6 *Listeria*, 25 *Nocardia*, и 4 *Propionibacterium* вида.

c Для этих родов общее количество таксонов в базе данных Andromas: 5 *Arthrobacter*, 6 *Brevibacterium*, 1 *Dermabacter*, 1 *Erysipelothrix*, 1 *Gardnerella*, 3 вида *Paenibacillus*, 1 вид *Rhodococcus* и 1 вид *Turicella*.

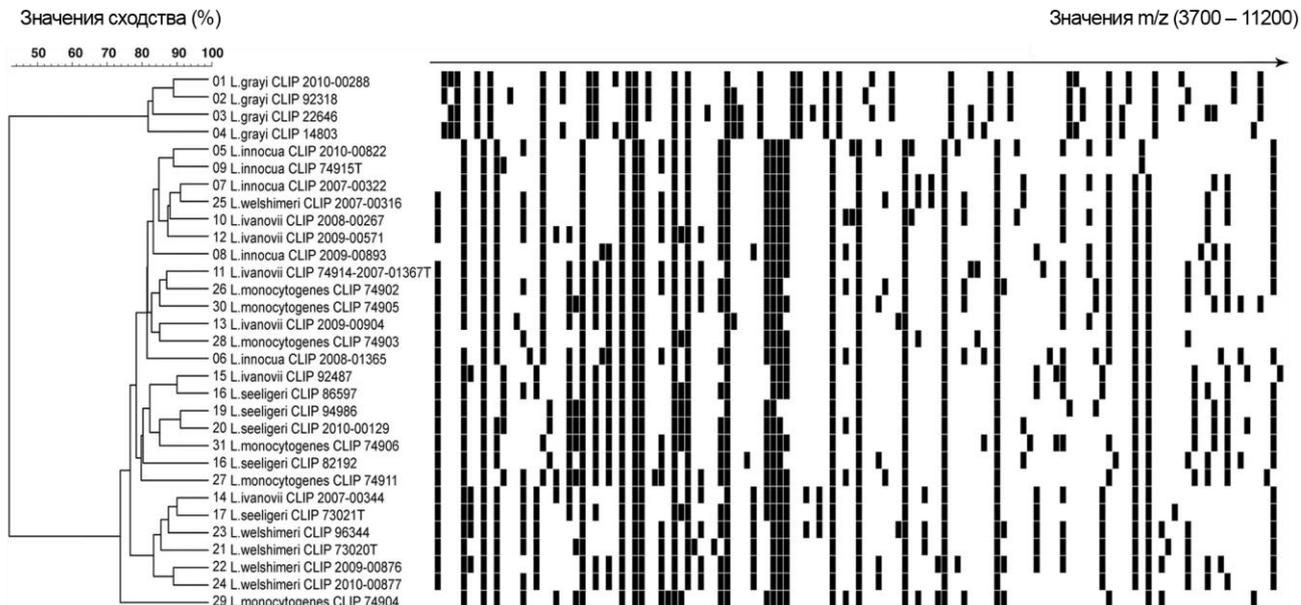


Рис.1 Дискриминация видов *Listeria* с помощью MALDI-TOF MS. Профили MALDI-TOF MS изолятов *Listeria*, полученные методом прямого нанесения колоний, визуализированы в виде геля. Спектры были сгруппированы с помощью алгоритма кластеризации UPGMA. Шкала представляет процент совпадения пиков масс между индивидуальными спектрами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа является первым MALDI-TOF MS исследованием, посвященным вопросу точности этого нового метода идентификации бактерий, по довольно обширной коллекции грамположительных палочек, включающей как патогенные виды, так и комменсалы. Наиболее важный результат исследования заключается в том, что подавляющее большинство патогенных ГПП могут быть идентифицированы до вида. Кроме того, мы также точно идентифицировали непатогенные или низкопатогенные виды. Поскольку большинство этих штаммов получены из клинических микробиологических лабораторий и представляют ГПП, наиболее часто там выделяемые, то на основе наших данных можно предположить, что эта стратегия идентификации также может быть применена для исключения патогенных возбудителей и описания новых связанных с ГПП инфекционных заболеваний.

В данном исследовании MALDI-TOF MS идентификация бактериальных изолятов была проведена с помощью метода прямого нанесения колоний – т.е. в условиях обычного рабочего процесса всех микробиологических лабораторий. Сходные результаты получены после предварительной экстракции на системе Biotyper, Bruker (3, 6, 29, 51). Каждая MALDI-TOF MS система идентификации имеет свои особенности, включая собственно аппаратуру (масс-спектрометр), путь, каким была построена база данных, алгоритмы для сравнения масс-спектра образца со спектрами базы данных. Поэтому непростая задача - выявить причину, по которой на системе Andromas при методе прямого нанесения были получены лучшие результаты. Хорошо установлено, что качество масс-спектров изменяется в зависимости от рода бактерий. Например, лучшие MALDI-TOF MS масс-спектры (с большим количеством пиков и/или с более высокой интенсивностью пиков) обычно получают для грамотрицательных бактерий (кроме слизистых колоний) по сравнению с энтерококками и грамположительными палочками (4). Вследствие этого использование базы данных, полученной с применением экстракции, скорее всего, приводит к тому, что ошибки идентификации будут происходить чаще с грамположительными бактериями, чем с грамотрицательными. База данных Andromas построена без предварительной экстракции, и этот технический момент, вероятно, оказывает важное влияние на качество получаемых результатов. Насколько нам известно, стратегия построения баз данных bioMérieux и Bruker ранее не сообщалась и не публиковалась.

На основе наших данных можно предположить, что идентификации *Listeria* spp. методом прямого нанесения колоний можно достичь только до рода, за исключением *L. grayi*. Сообщалось, что, используя систему Biotyper, можно идентифицировать *Listeria* spp. до вида и

типа (6). Тем не менее, сложная стадия экстракции и несколько центрифугирований, необходимые для получения подобных результатов, могут быть неосуществимы в повседневной практике клинических микробиологических лабораторий. Так как *L. monocytogenes* вызывает практически все случаи листериоза у человека, то быстрая идентификация изолята ГПП до *Listeria* sp. уже является значительным прогрессом. Небольшое количество ГПП других родов не удалось идентифицировать до вида, поскольку масс-спектры анализируемых изолятов соответствовали сразу двум видоспецифичным профилям одного рода или по причине атипичного масс-спектра, или из-за неудовлетворительного качества полученного масс-спектра. В целом, хотя эти наблюдения и иллюстрируют ограничения стратегии системы MALDI-TOF Andromas для идентификации ГПП, мы получили видовую идентификацию изолятов *Corynebacterium* и *Nocardia* методом прямого нанесения колоний, сходную с идентификацией системой Biotyper при предварительной экстракции. Это предполагает, что более простой подход может быть использован для идентификации ГПП.

Быстрая идентификация ГПП должна иметь важное клиническое влияние для диагностики связанных с ГПП инфекционных заболеваний. Редко встречающиеся заболевания, такие как гранулематозный лимфаденит из-за *C. pseudotuberculosis* или кожные проявления *C. ulcerans* или *C. diphtheriae*, могут быть диагностированы ранее (27, 33, 52). В таком случае главное преимущество метода прямого нанесения колоний – обеспечить быструю идентификацию колоний, которые нельзя отличить от других нелиполитических видов *Corynebacterium*. MALDI-TOF MS может улучшить диагностику “привередливых” или недавно описанных видов ГПП, как, например, новые виды *Actinomyces* (26, 35, 39, 45). Кроме того, быстрая идентификация ГПП должна улучшить антимикробное лечение пациентов. Действительно, некоторые ГПП имеют специфичный и атипичный характер чувствительности, как, например, резистентность к цефалоспорином широкого спектра действия у *L. monocytogenes*, и резистентность к гликопептидам у *E. rhusiopathiae*, некоторых *Nocardia* spp. и некоторых *Lactobacillus* spp. (15, 24, 50). Отдельные ГПП, как, например, *C. jeikeium* и в меньшей степени *C. urealyticum* и *C. amycolatum*, могут обладать множественной устойчивостью (40).

Итак, полученные данные свидетельствуют о том, что стратегия Andromas является точным методом идентификации и/или скрининга патогенных ГПП. Изменения в таксономии и описание новых видов или геномовидов ГПП – явления частые, и необходимое продолжающееся пополнение баз данных MALDI-TOF MS будет носить характер динамического процесса.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы признательны Gilles Quesnes за техническую помощь. Эта работа поддержана грантами Больничной программы клинических исследований (PHRC; гранты №№ BOS07001 и AOM08181). Julie Leto и Brunhilde Dauphin являются сотрудниками Andromas. Xavier Nassif акционер Andromas.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adderson EE, et al. 2008. Identification of clinical coryneform bacterial isolates: comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and *rpoB* genes. J. Clin. Microbiol. **46**:921–927.
2. Alanio A, et al. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. Clin. Microbiol. Infect. **17**:750–755.
3. Alatoon AA, Cazanave CJ, Cunningham SA, Ihde SM, Patel R. 2012. Identification of non-*diphtheriae* *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. **50**:160–163.
4. Alatoon AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. 2011. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of Gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. **49**:2868–2873.
5. Bank S, Jensen A, Hansen TM, Soby KM, Prag J. 2010. *Actinobaculum schaalii*, a common uropathogen in elderly patients, Denmark. Emerg. Infect. Dis. **16**:76–80.
6. Barbuddhe SB, et al. 2008. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. **74**:5402–5407.
7. Bille E, et al. 27 September 2011. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. Clin. Microbiol. Infect. [Epub ahead of print.] doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03688.x.
8. Bille J, et al. 1992. API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. Appl. Environ. Microbiol. **58**:1857–1860.
9. Bizzini A, et al. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. J. Clin. Microbiol. **49**:693–696.

10. **Boyd MA, Antonio MA, Hillier SL.** 2005. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5309–5311.
11. **Carbannelle E, et al.** 2007. Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2156–2161.
12. **Carbannelle E, et al.** 2012. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *J. Microbiol. Methods* **89**:133–136.
13. **Carbannelle E, et al.** 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin. Biochem.* **44**:104–109.
14. **Collins MD, et al.** 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:240–246.
15. **Danielsen M, Wind A.** 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* **82**:1–11.
16. **Degand N, 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.
17. **Devulder G, Perriere G, Baty F, Flandrois JP.** 2003. BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1785–1787.
18. **Dupont C, et al.** 2010. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**:998–1004.
19. **Ferroni A, 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.
20. **Fujisawa T, Mori M.** 1994. Evaluation of media for determining hemolytic activity and that of API Listeria system for identifying strains of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1127–1129.
21. **Funke G, Lawson PA, Bernard KA, Collins MD.** 1996. Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1124–1128.
22. **Funke G, Renaud FN, Freney J, Riegel P.** 1997. Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne database 2.0. *J. Clin. Microbiol.* **35**:3122–3126.
23. **Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE III, Bernard KA.** 1997. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:125–159.
24. **Gorby GL, Peacock JE, Jr.** 1988. Erysipelothrix rhusiopathiae endocarditis: microbiologic, epidemiologic, and clinical features of an occupational disease. *Rev. Infect. Dis.* **10**:317–325.
25. **Hall V.** 2008. Actinomyces—gathering evidence of human colonization and infection. *Anaerobe* **14**:1–7.
26. **Hwang SS, et al.** 2011. Actinomyces graevenitzii bacteremia in a patient with alcoholic liver cirrhosis. *Anaerobe* **17**:87–89.
27. **Join-Lambert OF, et al.** 2006. Corynebacterium pseudotuberculosis necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**:848–851.
28. **Khamis A, Raoult D, La Scola B.** 2005. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1934–1936.
29. **Konrad R, et al.** 2010. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic Corynebacterium species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. *Euro Surveill.* **15**:19699. http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId_19699
30. **La Scola B.** 2011. Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry-based approaches for the diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **11**:287–298.
31. **Lavollay M, et al.** 2009. The beta-lactam-sensitive D,D-carboxypeptidase activity of Pbp4 controls the L,D and D,D transpeptidation pathways in *Corynebacterium jeikeium*. *Mol. Microbiol.* **74**:650–661.
32. **Lotz A, 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.
33. **Lowe CF, Bernard KA, Romney MG.** 2011. Cutaneous diphtheria in the urban poor population of Vancouver, British Columbia, Canada: a 10-year review. *J. Clin. Microbiol.* **49**:2664–2666.
34. **McLaughlin J.** 1997. The identification of *Listeria* species. *Int. J. Food Microbiol.* **38**:77–81.
35. **Nielsen HL, Soby KM, Christensen JJ, Prag J.** 2010. Actinobaculum schaalii: a common cause of urinary tract infection in the elderly population. Bacteriological and clinical characteristics. *Scand. J. Infect. Dis.* **42**:43–47.
36. **Pacheco LG, et al.** 2007. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J. Med. Microbiol.* **56**:480–486.
37. **Perry AL, Lambert PA.** 2006. Propionibacterium acnes. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**:185–188.
38. **Pimenta FP, et al.** 2008. A PCR for dtxR gene: application to diagnosis of non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol. Cell. Probes* **22**:189–192.
39. **Reinhard M, et al.** 2005. Ten cases of *Actinobaculum schaalii* infection: clinical relevance, bacterial identification, and antibiotic susceptibility. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5305–5308.
40. **Riegel P, Ruimy R, Christen R, Monteil H.** 1996. Species identities and antimicrobial susceptibilities of corynebacteria isolated from various clinical sources. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**:657–662.
41. **Rocourt J, Buchrieser C.** 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification, p 1–20. *In* Ryser ET, MarthEH(ed), *Listeria, listeriosis, and food safety*, 3rd ed, vol 1. CRC Press, Boca Raton, FL.
42. **Rodriguez-Nava V, et al.** 2006. Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for *hsp65* gene-based identification of *Nocardia* species. *J. Clin. Microbiol.* **44**:536–546.
43. **Saffert RT, et al.** 2011. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of Gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **49**:887–892.
44. **Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Quinn F, Mabilat C.** 1996. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:669–674.
45. **Santala AM, et al.** 2004. Evaluation of four commercial test systems for identification of *Actinomyces* and some closely related species. *J. Clin. Microbiol.* **42**:418–420.
46. **Seeliger HPR, Jones D.** 1986. Genus *Listeria*, p 1235–1245. *In* Holt JG, Krieg NR, SneathPH(ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
47. **Seng P, 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.
48. **Seng P, et al.** 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* **5**:1733–1754.
49. **Tauch A, et al.** 2008. The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete genome sequence established by pyrosequencing. *J. Biotechnol.* **136**:11–21.
50. **Troxler R, von Graevenitz A, Funke G, Wiedemann B, Stock I.** 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**:525–535.
51. **Verroken A, et al.** 2010. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *J. Clin. Microbiol.* **48**:4015–4021.
52. **Wagner J, et al.** 2001. Infection of the skin caused by *Corynebacterium ulcerans* and mimicking classical cutaneous diphtheria. *Clin. Infect. Dis.* **33**:1598–1600.

53. **Wattiau P, Janssens M, Wauters G.** 2000. *Corynebacterium simulans* sp. nov., a non-lipophilic, fermentative *Corynebacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:347–353.
54. **Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY.** 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**:908–934.
55. **Yassin AF, Steiner U, Ludwig W.** 2002. *Corynebacterium aurimucosum* sp. nov. and emended description of *Corynebacterium minutissimum* Collins and Jones (1983). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1001–1005.