

Отчет по оценке времяпролетного масс-спектрометра Smart MS

5020

Dr. R. Zhang, Dr. Hongw. Zhou Bacteriological Lab, The Second Affiliated Hospital Zhejiang

University School of Medicine, P.R. China, 20th May, 2022

Краткое содержание:

Целью данного отчета является оценка точности времяпролетного масс-спектрометра Zhuhai DL Smart MS 5020 (в дальнейшем называемого система Smart MS 5020) при идентификации распространенных микроорганизмов, имеющих клиническое значение, а также трудноразличимых микроорганизмов и определения до вида, видов, входящих в комплексы. Система Smart MS 5020 была использована для анализа 822 клинических изолятов, полученных во втором аффилированном госпитале медицинской школы Чжецзянского Университета. Изоляты, относящиеся к 18 родам и 48 видам и комплексам видов были получены в период с 2016 по 2021 г. Прибором сравнения выступал времяпролетный масс-спектрометр Microflex производства немецкой компании Bruker Daltonics. В случае несовпадения результатов в качестве «золотого стандарта» для идентификации использовалось секвенирование 16S rDNA, а также иные молекулярно-биологические методы. В случае идентификации видов микроорганизмов, входящих в комплексы, таких, как *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* и *Klebsiella pneumoniae* с подвидами, в качестве «золотого стандарта» было использовано полногеномное секвенирование. Уровень точности системы Microflex при идентификации штаммов в ходе настоящего эксперимента составляет 100% (822/822, 95%CI 99.53-100%). Уровень совпадения при идентификации до вида между системой Smart MS 5020 и системой Microflex составил 99,76% (820/822; 95% CI 99.12-99.93%), при этом 2 штамма *S. epidermidis* были неверно идентифицированы, как *S. kottii*. Система Smart MS 5020 верно идентифицировала 100% грамм-отрицательных микроорганизмов (426/426; 95%CI 99.11-100%), грамм-положительные микроорганизмы были верно идентифицированы в 99.44% случаях (353/355; 95%CI 99.97-99.85%). Верно были идентифицированы 100% дрожжеподобных микроорганизмов. Система Smart MS 5020 позволила получить надежные результаты идентификации как обычных клинических изолятов, так и трудноразличимых видов из таких родов, как *Haemophilus* и *Streptococcus*.

1. Источник изолятов:

Всего за период с 2016 по 2021 год от второго аффилированного госпиталя медицинской школы при Чжецзянском университете было получено 822 штамма относящихся к 48 видам из 18 родов, включая грамм-положительные, грамм-отрицательные бактерии, дрожжеподобные грибы и трудноразличимые виды из родов *Streptococcus* и *Haemophilus*, а также виды, относящиеся к распространенным комплексам. Из них 426 штамма, относящихся к 22 видам, были грамм-отрицательными бактериями, 355 штаммов,

относящихся к 20 видам, были грамм-положительными бактериями, и 41 штамм, относившийся к 6 видам, были дрожжеподобными грибами. MALDI-TOF масс-спектрометр Smart MS 5020 с базой данных микроорганизмов и реагентами были предоставлены компанией Zhuhai DL biotech Co., Ltd. Масс-спектрометр MALDI-TOF Microflex с базой данных DB2969 и соответствующими реагентами были приобретены у компании Bruker Daltonics, Германия.

2. Методика тестирования:

2.1 Активация культур микроорганизмов: после активации ранее сохраненных культур микроорганизмов они переносились на кровяной агар Columbia, шоколадный агар, или на среду Sabao weak medium, в зависимости от штамма, инкубировались при 35°C в течении 18-24 часов. В том случае, если рост был медленным, срок инкубации продлевался.

2.2 Идентификация: использовались две системы для параллельной идентификации исследуемых штаммов методом прямого нанесения. Брали 1 небольшой фрагмент колонии из чистой культуры, наносили непосредственно на мишень после чего добавляли 1 мкл раствора матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота – CHCA). В случае дрожжей сначала добавляли 1 мкл 70% муравьиной кислоты, а уже после высыхания добавляли 1 мкл матрицы. После высыхания мишени помещали в прибор для проведения идентификации и анализа.

2.3 Интерпретация результатов: в соответствии с эксплуатационной документацией для Microflex полученный в ходе идентификации балл ≥ 2.00 означает, что определение до вида достоверно, балл в интервале 1.70-1.99 означает достоверное определение до рода, в случае балла ≤ 1.70 результат идентификации был не надежным.

В тех случаях, когда не удавалось получить надежную идентификацию на одном или на обоих приборах, или результаты, полученные на разных приборах, не совпадали, для подтверждения использовалось секвенирование 16S rRNA. Экстракция нуклеиновых кислот производилась в соответствии с инструкцией к набору для экстракции генома, экстрагированные материалы направлялись для проведения ПЦР анализа и секвенирования в компанию Shanghai Bioengineering Co., Ltd. Для идентификации микроорганизма результаты секвенирования сверялись с геной библиотекой NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В данном исследовании были проведены идентификации микроорганизмов, входящих в комплексы *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* и *Klebsiella pneumoniae* с подвидами, при этом результаты идентификации подтверждались при помощи полногеномного секвенирования (экстракция нуклеиновых кислот в соответствии с инструкцией набора для экстракции). Экстрагированные материалы направлялись для секвенирования в компанию Beijing Nuohezhiyuan Technology Co., Ltd. Для идентификации микроорганизмов результаты секвенирования сверялись с библиотекой генов NCBI (<https://pubmlst.org/software/bigdb>). Данная методика использовалась в качестве «золотого стандарта» при идентификации комплексов.

2.3 Определение терминов

2.3.1 Точная идентификация: идентификационные баллы для обеих масс-спектрометрических систем (Microflex и Smart MS 5020) ≥ 2.00 , результаты идентификации, полученные на обеих системах достоверны и соответствуют результатам, полученным при

помощи эталонного метода. Белковые спектры многих видов, входящих в комплексы, очень похожи, поэтому как определение до комплекса, так и определения до вида, входящего в комплекс расцениваются, как точная идентификация. Видовые комплексы, с которыми работали в данном исследовании:

:

(1) Комплекс *Acinetobacter baumannii* [1]: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* и *A. pittii*;

(2) Комплекс *Enterobacter cloacae* [2]: *E. cloacae*, *E. aeruginosa*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. nimipressuralis* и *E. mori*;

(3) *Klebsiella pneumoniae* и ее подвиды [3]: *K. pneumoniae*, *K. variicola*, *K. quasipneumoniae*, *K. Michigan*;

2.3.2 Идентификация до рода: идентификационный балл, полученный в ходе идентификации на обеих системах (*Microflex and Smart MS 5020 system*), находится в интервале 1.70-1.99, или в случае, когда полученное название рода и результаты соответствуют эталонной методике для идентификации до уровня рода.

2.3.3 Отсутствие идентификации: идентификационный балл, полученный на обеих системах (*Microflex and Smart MS 5020*) был ниже 1.70, что расценивалось как ненадежный результат и отсутствие идентификации.

2.3.4 Ошибка идентификации: система расценивает результат, как достоверный, но он не соответствует результату, полученному эталонным методом.

3. Результат

3.1 Грамм-отрицательные бактерии

Как *Smart MS 5020* так и *Microflex* продемонстрировали 100% (95%CI 99.11-100%) точной идентификации 462 грамм-отрицательных бактерий, относящихся к 20 видам из 12 родов, а также к комплексам *Acinetobacter baumannii* (29 штаммов), *Enterobacter cloacae* (30 штаммов) и *Klebsiella pneumoniae* с подвидами (113 штаммов). В данном исследовании все они были идентифицированы до вида или до комплекса. В некоторых работах указывалось на сложности с масс-спектрометрической идентификацией *Haemophilus*, в то время как система *Smart MS 5020* правильно идентифицировала 45 штаммов *Haemophilus*, что свидетельствует о высоком качестве идентификации.

	Кол-во (штаммов)	Точная идентификация (штаммов)	Идентификация до рода (штаммов)	Нет идентификации (штаммов)	Неправильная идентификация (штаммов)
<i>Klebsiella</i>	132				
<i>Klebsiella oxytoca</i>	19	19			
<i>Klebsiella pneumoniae</i> and subspecies	113	113			
<i>Klebsiella aerogenes</i>	4	4			
<i>Enterobacter</i>	30				

Enterobacter cloacae комплекс	30	30			
Escherichia	60				
Escherichia coli	60	60			
Serratia sp.	7				
Serratia marcescens	7	7			
Citrobacter	5				
Citrobacter freundii	4	4			
Citrobacter Klebsiella	1	1			
Morganella	5				
Morganella morganii	5	5			
Pseudomonas	44				
P. aeruginosa	43	43			
Pseudomonas	1	1			
Stenotrophomonas	38				
Stenotrophomonas maltophilia	38	38			
Acinetobacter	30				
Acinetobacter baumannii complex	29	29			
Acinetobacter	1	1			
Haemophilus Winslow et al	45				
Haemophilus influenzae	29	29			
Haemophilus parainfluenzae	8	8			
Hemophilus hemolyticus	3	3			
Haemophilus parahaemolyticus	5	5			
Chryseobacterium	9				
Haemoxanthus meningitidis	9	9			
Moraxella	17				
Moraxella catarrhalis	17	17			

Всего грамм-отрицательных бактерий	426	426	0	0	0
------------------------------------	-----	-----	---	---	---

3.2 Грамм-положительные бактерии

Точность идентификации на системе Microflex для 355 изолятов грамм-положительных бактерий, относящихся к 20 видам из 4 родов, составила 100% (355/355, 95%CI 98.93-100%). Система Smart MS 5020 правильно идентифицировала 99,44% изолятов (95% CI 99.97-99.85%), причем 2 штамма *Staphylococcus epidermidis* были неправильно идентифицированы, как *Staphylococcus korekii*.

	Кол-во (штаммов)	Точная идентификация (штаммов)	Идентификация до рода (штаммов)	Нет идентификации (штаммов)	Неправильная идентификация (штаммов)
Staphylococcus	120				
Staphylococcus aureus	42	42			
Staphylococcus haemolyticus	16	16			
Staphylococcus epidermidis	42	40			2
Staphylococcus capitis	5	5			
Staphylococcus hominis	4	4			
Staphylococcus cohnii	5	5			
Staphylococcus sciuri	2	2			
Staphylococcus lugdunensis	1	1			
Staphylococcus	3	3			
Enterococcus	195				
Enterococcus faecalis	86	86			
E. faecium	73	73			
E. gallinarum	6	6			
Enterococcus casseliflavus	12	12			

Enterococcus Thai	4	4			
Enterococcus raffinosus	2	2			
Enterococcus avium	10	10			
Enterococcus hirae	2	2			
Streptococcus	20				
S.pneumoniae	20	20			
Corynebacterium sp	20				
Corynebacterium striatum	19	19			
Corynebacterium proximity	1	1			
Всего грамм-отрицательных бактерий	355	353			2

3.3 Дрожжеподобные грибы

Как Smart MS 5020 так и Microflex продемонстрировали 100% (95%CI 91.43-100%) точной идентификации 41 изолята дрожжеподобных грибов, относящихся к 6 часто встречающихся в клинической практике видов.

	Кол-во (штаммов)	Точная идентификация (штаммов)	Идентификация до рода (штаммов)	Нет идентификации (штаммов)	Неправильная идентификация (штаммов)
Candida lusitanae	4	4			
Candida glabrata	5	5			
C.tropicalis	7	7			
Candida smooth	2	2			
Candida albicans	20	20			
Trichospora Assa	3	3			
Всего дрожжеподобных грибов	41	41			

3.4 Комплексы

	Кол-во (штаммов)	Точная идентификация (штаммов)	Идентификация до рода (штаммов)	Нет идентификации (штаммов)	Неправильная идентификация (штаммов)
Acinetobacter baumannii комплекс					
A. baumannii	19	19	0	19	0
Acinetobacter Pichia	10	10	0	10	0
Enterobacter cloacae комплекс					
E.asburiae	5	1	5	1	5
E.cloacae	8	0	8	8	0
Enterobacter hormaechei	10	3	7	0	10
Enterobacter kobei	6	2	4	1	5
Enterobacter reuteri	1	1	0	0	1
Klebsiella pneumoniae с подвидами					
klebsiella pneumoniae	108	108	0	108	0
Штамм подобный klebsiella pneumoniae	4	0	4	0	4
Klebsiella Michigan	1	0	1	0	1

Обе масс-спектрометрические системы смогли точно идентифицировать виды в 19 изолятах A. Baumannii и 10 изолятах Acinetobacter pichia. При идентификации видов комплекса Enterobacter cloacae были отмечены некоторые сложности для обеих систем. Хотя в базах обеих систем содержатся данные о 5 обычных характерных видов, входящих в данный комплекс (Enterobacter aeruginosa, Enterobacter cloacae, Enterobacter hallii, Enterobacter kobe и Enterobacter reuteri), из 30 изолятов видов данного комплекса, использованных в данном исследовании (5 Enterobacter aeruginosa, 8 Enterobacter cloacae, 10 Enterobacter hallii, 6 Enterobacter Kobe and 1 Enterobacter reuteri) система Smart MS 5020 смогла точно идентифицировать до вида только 7 изолятов, в то время как Microflex смог это сделать для

10 изолятов. При анализе 113 изолятов комплекса *Klebsiella pneumoniae* с подвидами, куда входили 109 изолятов *Klebsiella pneumoniae*, 4 изолята *Klebsiella*-подобных бактерий и 1 изолят *Klebsiella Michigan*, обе системы идентифицировали изоляты, как *Klebsiella pneumoniae*. Это произошло из-за отсутствия ряда видов комплекса в базах обеих систем (в базах обеих систем есть данные только о двух видах (*Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella mutans*) и близости видов данного комплекса.

Моно сделать вывод, что система Smart MS 5020 отличается высоким уровнем точности идентификации 99.76% (820/822; 95%CI 99.12-99.93%), что позволяет обеспечивать быструю и надежную идентификацию обычных в клинической практике патогенов. Она хорошо определяет трудные для идентификации виды таких родов, как *Streptococcus* и *Haemophilus*. Надежность идентификации до комплекса также высокая, но желательно улучшить идентификацию до видов, входящих в комплекс.

Использованные источники

- [1] I. Y. Na, E. S. Chung, C. Y. Jung, et al. Comparison of the Virulence-Associated Phenotypes of Five Species of *Acinetobacter baumannii* Complex[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(1):171-9.
- [2] A. Davin-Regli, J. P. Lavigne, J. M. Pagès. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(4)
- [3] S. W. Long, S. E. Linson, M. Ojeda Saavedra, et al. Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*[J]. *mSphere*, 2017, 2(4)