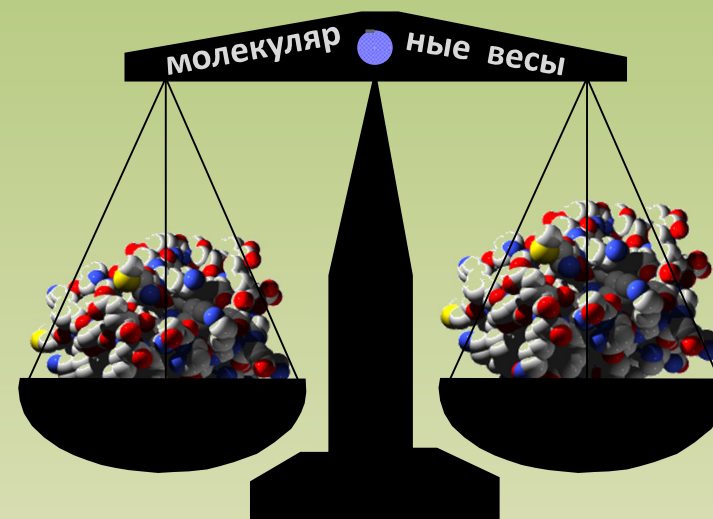


Масс-спектрометрия в практике
бактериологической лаборатории:
новые технологии и решения

Петрозаводск 2014

- **Масс-спектрометрия** – аналитический метод измерения массы молекул или атомов анализируемого вещества (аналита)

- **Масс-спектрометр** – инструмент, способный в условиях вакуума разделять находящиеся в газовой фазе заряженные частицы вещества согласно отношению их массы к заряду (m/z)



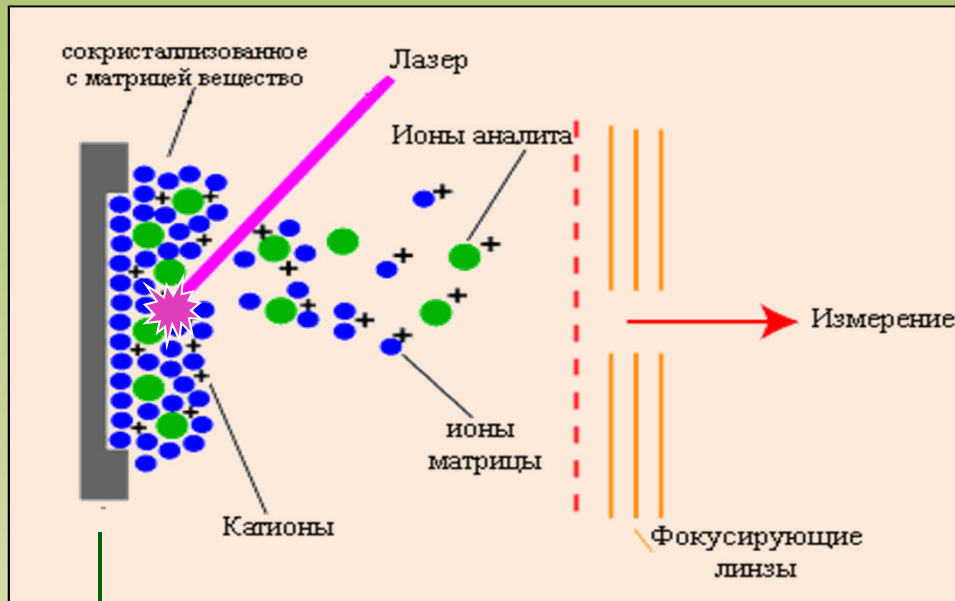
I этап масс-спектрометрического анализа



Koichi Tanaka

Мягкая ионизация - MALDI

Матрично-Активированная Лазерная Десорбция/Ионизация

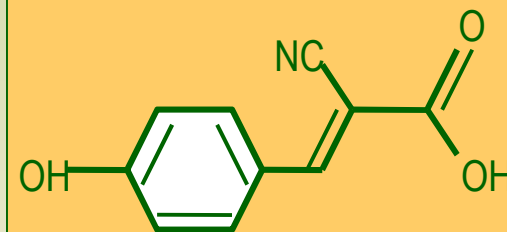


Сокристаллизованное с матрицей вещество

МАТРИЦА:

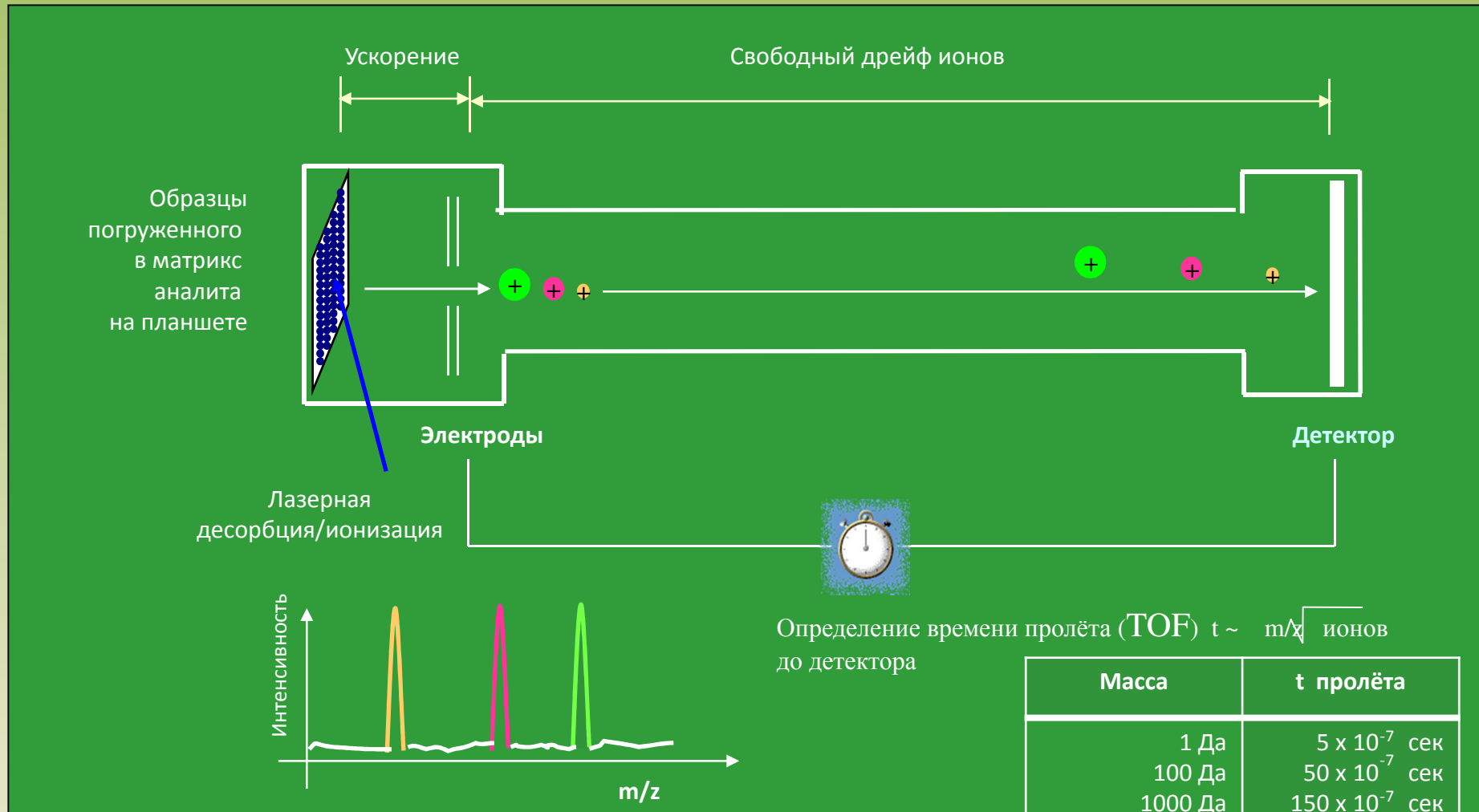
- Поглощает энергию лазерного излучения;
- "Вскипая", увлекает в газовую фазу молекулы аналита;
- Способствует ионизации

α - Циано-4-гидроксикоричная кислота



II этап масс-спектрометрического анализа

Сортировка ионов по массам по времени пролёта (TOF):



Определение времени пролёта (TOF) $t \sim \sqrt{m/z}$ ионов до детектора

Масса	t пролёта
1 Да	5×10^{-7} сек
100 Да	50×10^{-7} сек
1000 Да	150×10^{-7} сек
10 000 Да	500×10^{-7} сек

U=20 кВ, расстояние -1 м

Схема исследования

Пробоподготовка

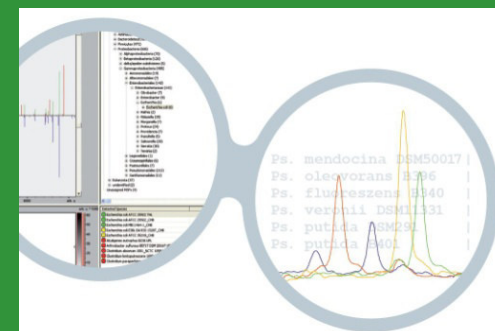


Первичный посев
клинического материала

MALDI-ToF



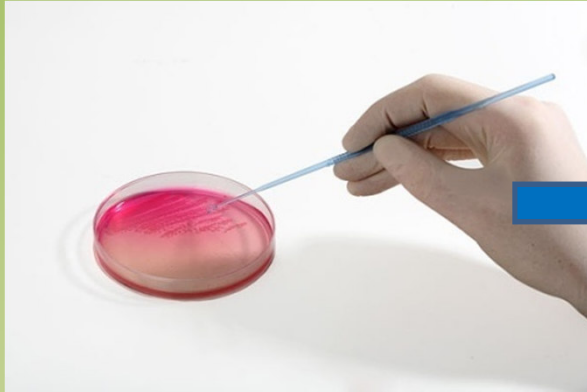
Идентификация Biotyper



Характеристики исследования:

- **Работа с первичными посевами**
- Быстрая и простая пробоподготовка: 5 минут/образец
- **Нет специальных расходных материалов (если не использовать такую опцию, как одноразовые мишени)**
- Предел измерения 10^4 - 10^5 клеток
- Скорость измерения: ~ 1 мин / образец
- Передача результатов на ЛИС

От колонии до результата



Неизвестный микроорганизм



Нанесение образца



Получение масс-спектра

Результат
идентификации

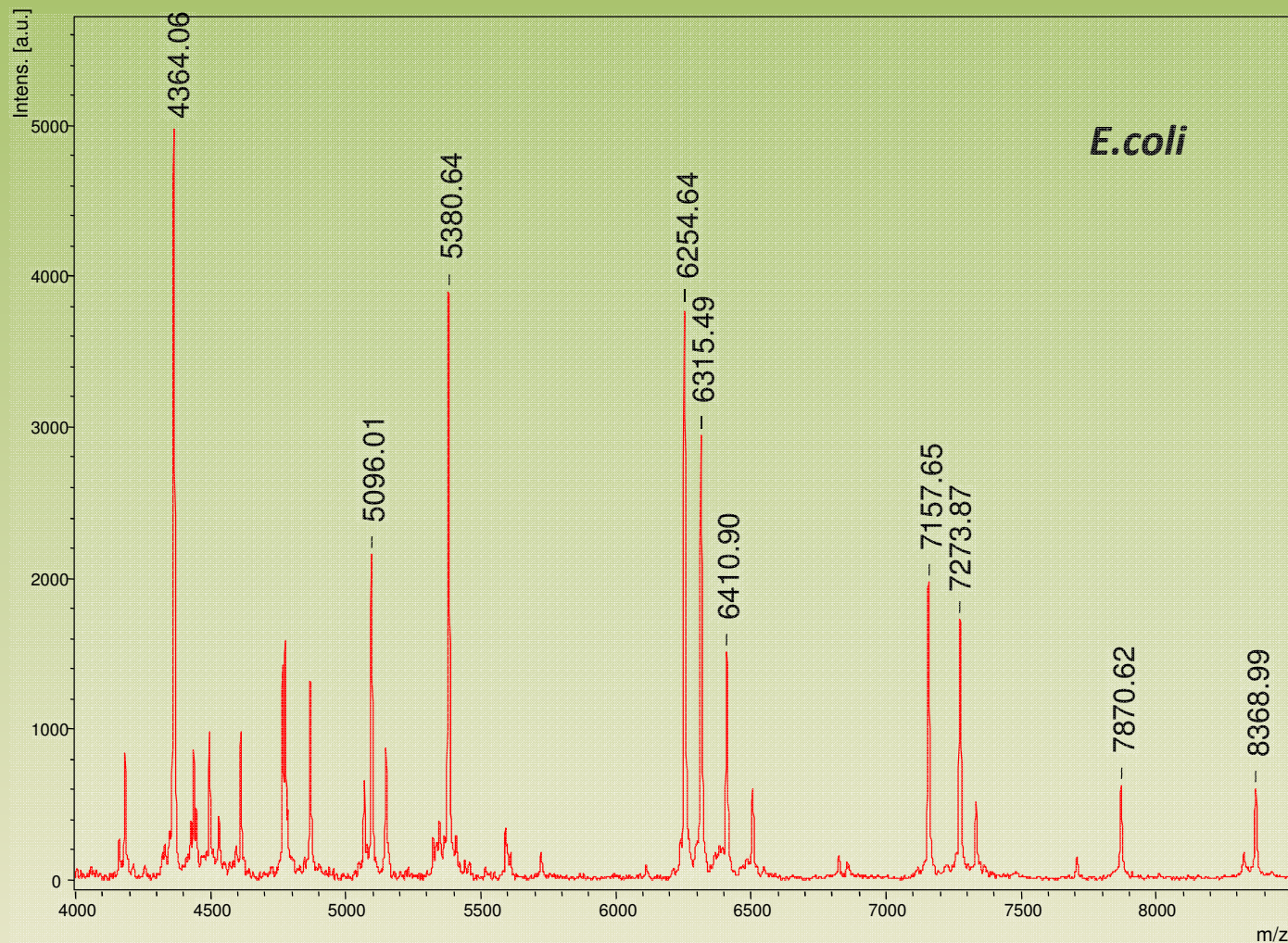
Analyte1

Analyte Name: Probe A
Analyte Description: measured at A1
Analyte ID: BTS
Analyte Creation Date/Time: 2008-12-08 14:14:55.802
Applied MSP Library(ies): IVD
Applied Taxonomy Tree:



Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Escherichia coli ATCC 25922_THL	2.454	562
2 (++)	Escherichia coli MB11464-1_CHB	2.249	562
3 (++)	Escherichia coli Nisl VML	2.238	562
4 (++)	Escherichia coli DH5alpha BRL	2.19	562
5 (++)	Escherichia coli DSM 30083 HAM	2.152	562
6 (++)	Escherichia coli ATCC 25922_CHB	2.124	562
7 (++)	Escherichia coli ESBL EA RSS 1528T_CHB	2.035	562
8 (+)	Escherichia fergusonii DSM 13698 HAM	1.967	564
9 (+)	Escherichia coli ATCC 35218_CHB	1.955	562
10 (+)	Escherichia coli W3350 MMG	1.905	562

MALDI-TOF MS профиль – определение константных белков



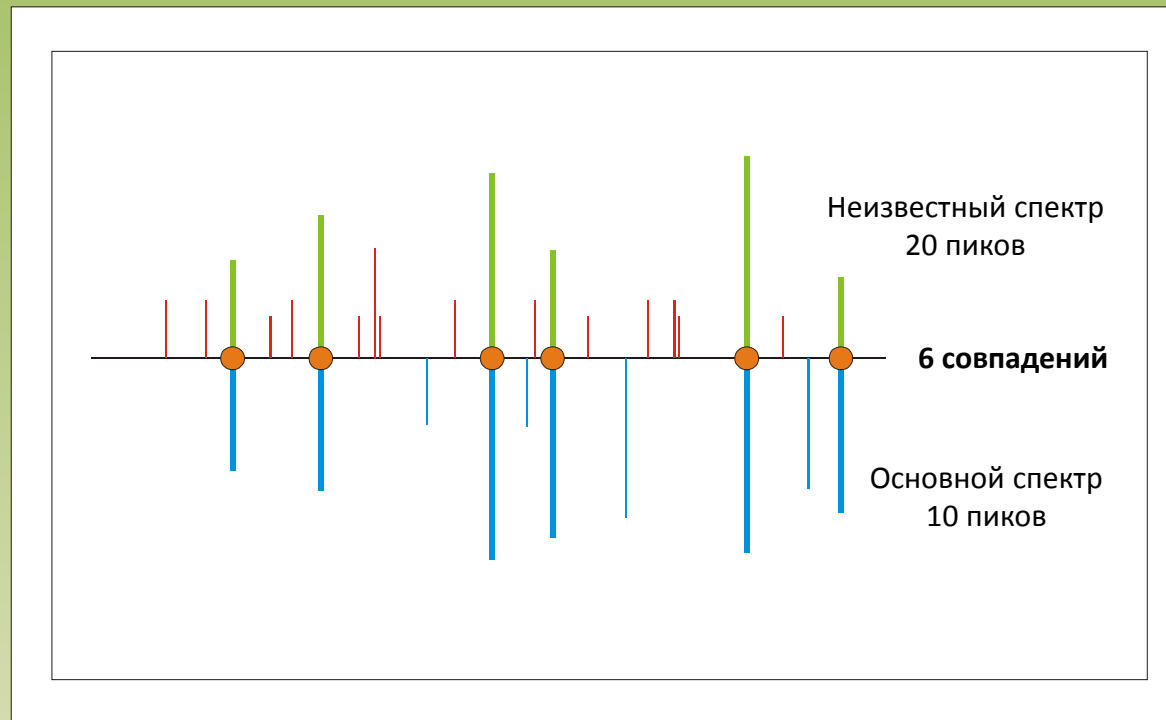
Линейные, в
положительной
области

500 вспышек
лазера, (10x50,
лазер 50 Гц)

~15 сек. на
образец, 1.5 часа
для 384 образца

Диапазон
молекулярных
масс в рутинных
исследованиях:
2000-20000 Da

Количественная оценка совпадения профилей



- Неизвестный микроорганизм соотносится с основным спектром в библиотеке
- Сортировка по уровню совпадения
- Использование пороговой величины для идентификации

Представление результатов

Classification Results



Project Info

Project Name: **My Project 312**
Project Description: contains very urgent data
Project Owner: kraeuter
Project Creation Date/Time: 2007-02-23 13:12:35.203
Project Analyte Count: 12

Analyte 1

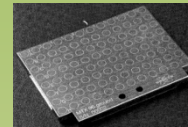
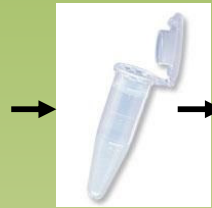
Analyte Name: **A1**
Analyte Description: measured at A1
Analyte ID: XY00001-1
Analyte Creation Date/Time: 2007-02-23 13:17:56.484

Match	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1	Acidiphilium acidophilum B349_UFL	2.527	76588
2	Pseudomonas lundensis DSM 6252T HAM	0.626	86185
3	Nocardia sp MB_9090_05 THL	0.408	1817
4	Enterococcus cloacae (PX) 22086116 I_MLD	0.407	550
5	Pseudomonas jessenii CIP 105274 HAM	0.383	77298
6	Escherichia coli ATCC 25922 THL	0.369	562
7	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 9295_1 CHB	0.358	72407
8	Pseudomonas abietaniphila CIP 106708 HAM	0.31	89065
9	Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi LMG 5011 HAM	0.306	29438
10	Pseudomonas rhodesiae DSM 14020T HAM	0.251	76760

Done

Trusted sites

MALDI Biotyper: прямое исследование МОЧИ



1мл мочи:
центрифуг./отмывка
/центрифуг.

Экстракция
бактериального осадка,
нанесение на мишень,
добавление матрикса

MALDI анализ и
автоматическая
идентификация

Быстрая идентификация бактерий – возбудителей ИМП с помощью MALDI-TOF MALDI-TOF MS

G. Schwarz, T. Maier, M. Kostrzewa, C. Boogen, U. Weller

48th ICAAC/46th IDSA |; Вашингтон, 25-28 октября 2008

Идентификация бактерий непосредственно из мочи с помощью MALDI-TOF MS типирования

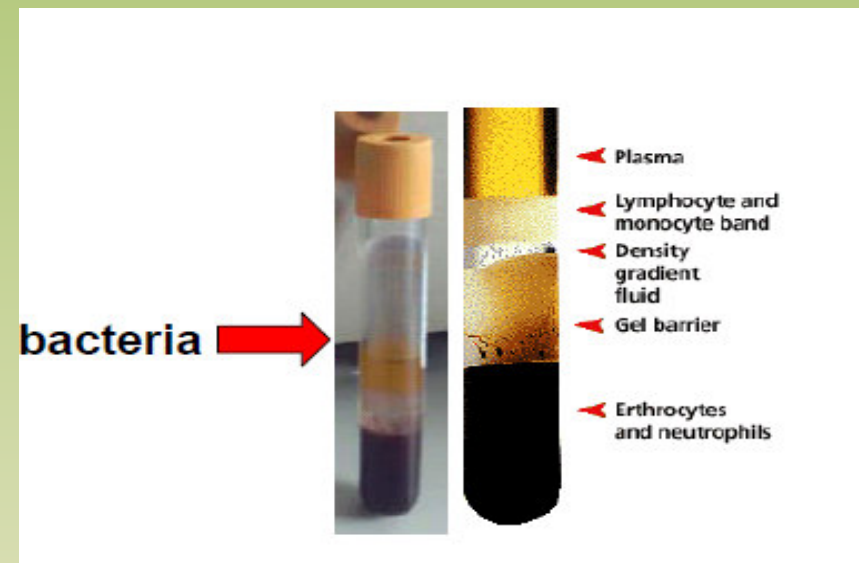
A. Borovskaya, E. Ilina, V. Govorun, O. Morozova, J. Ditmarova, A. Kruglov, T. Maier, M. Kostrzewa

19th ECCMID, Хельсинки, Финляндия, 16-19 мая 2009

MALDI Biotyper: прямое исследование культур крови

Weller et al., ICAAC 2008, Вашингтон:

- 2-4 мл содерж. флакона с ростом культуры, центрифугировать (10 мин)
- Слой над гелем, ресуспендировать в 1 мл бидист.
- Центрифугировать с низкой скоростью (3 мин)
- Перенести супернатант в новую пробирку Eppendorf
- Центрифугировать с высокой скоростью (3 мин)
- Общее время выделения бактерий: ~20 мин



MALDI Biotyper – развитие базы данных

Статус базы данных (БД) микроорганизмов Bruker на 05/2013:

4613 записей в БД (основных спектров/штаммов)

2185 видов

364 родов

2013 – заключено соглашение о сотрудничестве с голландским институтом CBS - Dutch Fungal Biodiversity Center (100 тыс. штаммов микроорганизмов)

Очень высокая доля отсеквенированных, референтных, ТИПОВЫХ ШТАММОВ

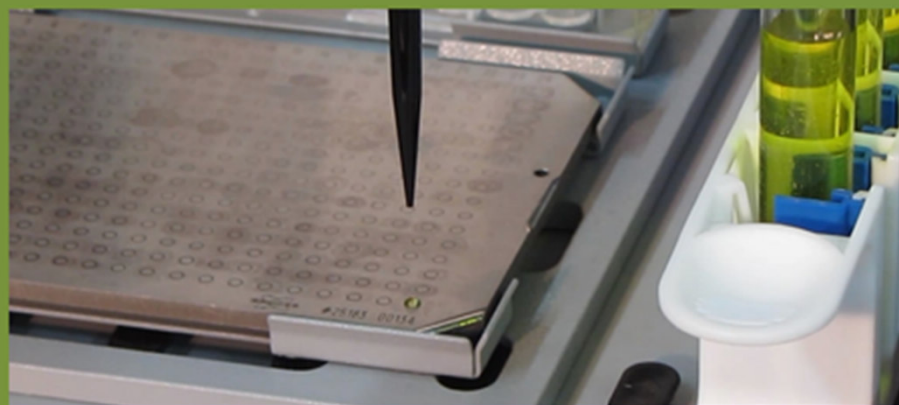
Перспективы автоматизации пробоподготовки, компания SCIROBOTICS на базе Pickolo (TECAN)

PetriLab™

Robotic Microbiology Workstation



**MALDI-TOF Spotting and Sample Preparation
using the Pickolo™ on Tecan robot**



Определение чувствительности к антибиотикам в автоматическом режиме

Варианты подключения системы MALDI Biotyper к автоматическим бак.анализаторам



CGM Analytix

CGM Analytix

BD EpiCenter™



bioMérieux:

Vitek 2

Vitek 2 Compact

Bact Alert



Becton Dickinson:

BD Phoenix™

Bactec

Закрытая система Vitek MS – решение от bioMérieux



Расходные материалы

VITEK MS

- 410893 Слайды для VITEK MS 32
- 411071 Матрикс для VITEK MS 5 x 0.5 мл
- 411072 Муравьиная кислота для VITEK MS 5 x 0.5 мл
- 411721 Силикагель для Vitek MS 500 г
- 411657 Набор для калибровки лазера 1

- 301090 LyfoCults Plus *E. faecalis* 19433 2
- 300953 LyfoCults Plus *C. glabrata* MYA-2950 2
- 301145 LyfoCults Plus *E. coli* 8739 2

MALDI BIOTYPER

- Ацетонитрил
- Муравьиная кислота
- Трифторуксусная кислота
- Матрица

- **Bruker Daltonik - Бактериальный стандарт (контр. штамм).**

- Набор «MALDI TOF проба», производства НПФ «Литех». Включает все необходимые для работы реагенты, РУ МЗ РФ – приобретается по желанию, как опция.

Некоторые технические характеристики: MALDI Biotyper vs Vitek MS

MALDI Biotyper

- **Мишени**

Мишени многоразовые. Промываются деионизированной водой и спиртом, либо обрабатываются перекисью водорода.

- **Верхняя граница диапазона определяемых масс**

300 000 Da - Все бактериальные белки укладываются в диапазон от **1000 до 20 000 Da**

- **Длина времяпролетной трубки (вакуумной трубки) - 1 м**

Длина трубки влияет только на разрешение отдельных пиков.

- **Ресурс лазера – не менее 60 млн. импульсов (вспышек)**

VITEK MS

- **Мишени**

Мишени только одноразовые. Несмотря на теоретическую возможность использования многоразовых мишеней, таких случаев не отмечено.

- **Верхняя граница диапазона определяемых масс**

500 000 Da

- **Длина времяпролетной трубки (вакуумной трубки) 1 м 20 см.**

Незначительная разница в разрешении не влияет на результаты идентификации

- **Ресурс лазера – не менее 60 млн. импульсов (вспышек)**

Некоторые технические характеристики: MALDI Biotyper vs Vitek MS

MALDI Biotyper

- **Вакуумный насос**
Турбомолекулярный + мембранного форвакуумного насоса. Не требует тех. обслуживания, тихий.
- **Очистка фокусирующей линзы от седиментов**
Автоматическая, выжигаются своим лазером.
- **Компьютерное управление**
Один управляющий компьютер с периферией
- **База данных микроорганизмов**
Возможность идентификации не менее, чем 2100 видов микроорганизмов
- **Возможность интеграции с автоматической системой для определения чувствительности к антимикробным препаратам**
Имеется для систем Vitek 2/2 Compact (ЛИС CGM Analytix), Phenix (BD Epicenter), Walk Away – в ближайшее время.

VITEK MS

- **Вакуумный насос**
Турбомолекулярный насос с роторной поддержкой . Роторный насос – замена масла раз в год, шумный.
- **Очистка фокусирующей линзы от седиментов**
Тех.обслуживание, снятие кожуха – как правило, означает вызов сервисного инженера.
- **Компьютерное управление**
Три компьютера: «станция пробоподготовки», «станция учета результатов», «система управления MYLA»
- **База данных микроорганизмов**
Возможность идентификации 755 видов клинически значимых микроорганизмов
- **Возможность интеграции с автоматической системой для определения чувствительности к антимикробным препаратам**
Имеется для систем Vitek 2/2 Compact (MYLA)

Масс-спектрометрическая идентификация чувствительности по деградации бактериальной клетки

Определение чувствительности грам(-) бактерий к β -лактамным антибиотикам

1. Инкубация суспензии бактериальных клеток с антибиотиком и энхансером
2. Детекция клеточной гибели масс-спектрометрическим измерением

Единовременное тестирование 6-ти образцов на чувствительность к защищенным ампициллинам, цефалоспорином 3-его поколения, карбапенемам

Разработка ООО НПФ Литех

Преимущества идентификации чувствительности по деградации бактериальной клетки

- Получение результатов через 5 часов
- Возможность идентификации бактерии в процессе оценки чувствительности
- Простота манипуляций
- Невысокая себестоимость
- Простота интерпретации результатов

Масс-спектрометрическое определение чувствительности



Инкубация суспензии
бактериальной культуры

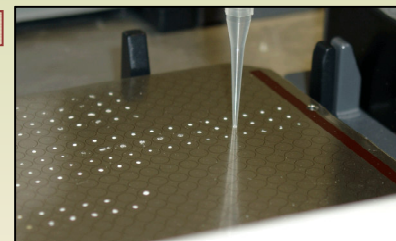
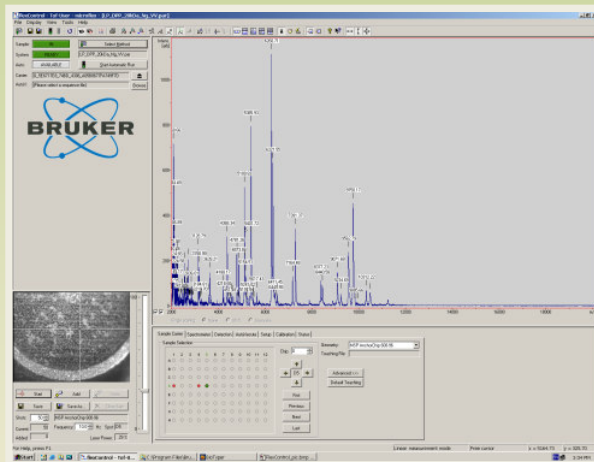


Супернатант бактериальной
культуры

96% этанол
-20°C

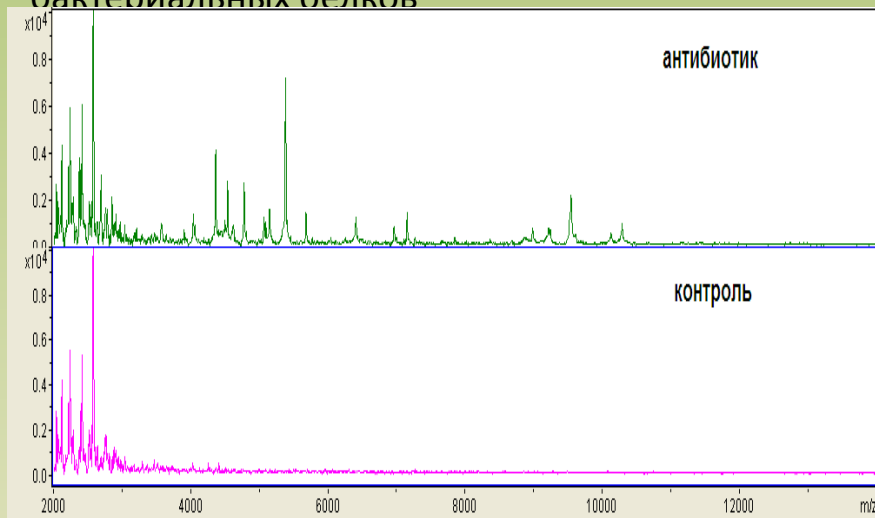
центрифугирование

Осадок в
70% муравьиной кислоте/ацетонитриле

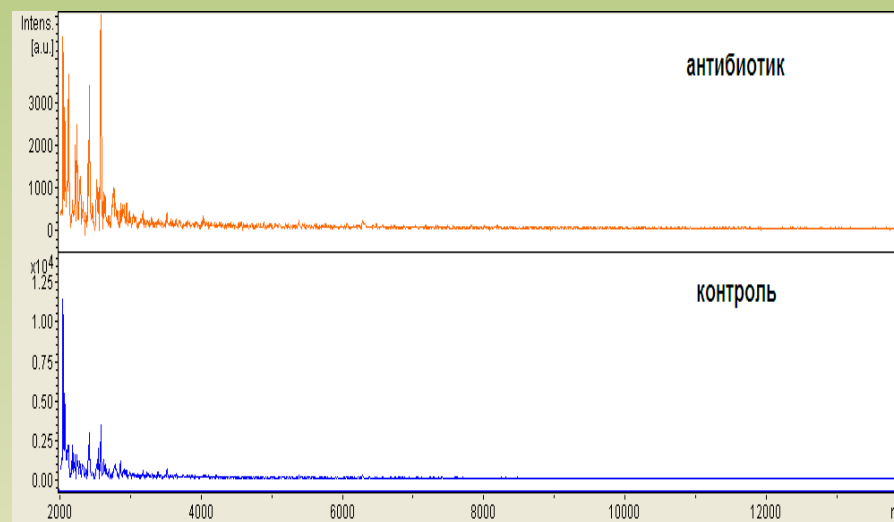


Детекция клеточной смерти с помощью MALDI масс-спектрометрии

Если бактерия чувствительна к антибиотику, происходит лизис клетки, и белки оказываются в супернатанте. На спектре присутствуют пики бактериальных белков

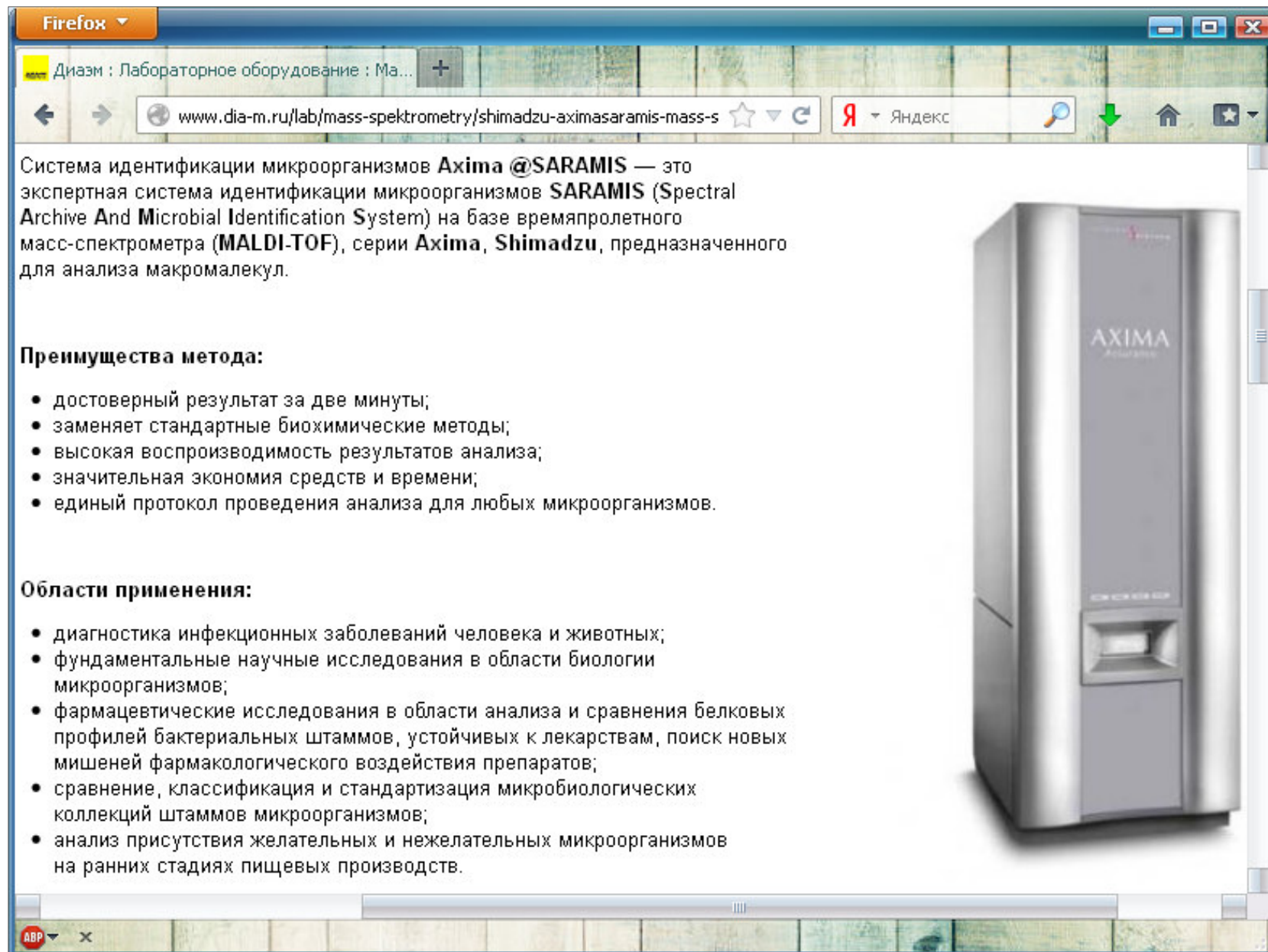


Если бактерия устойчива к антибиотику, клеточного лизиса не происходит. В спектре пиков нет



В обоих случаях отсутствует деградация бактериальной клетки в контрольном образце, куда не добавляется антибиотик

Система идентификации микроорганизмов Axima @SARAMIS




Система идентификации микроорганизмов **Axima @SARAMIS** — это экспертная система идентификации микроорганизмов **SARAMIS (Spectral Archive And Microbial Identification System)** на базе времяпролетного масс-спектрометра (**MALDI-TOF**), серии **Axima, Shimadzu**, предназначенного для анализа макромалекул.

Преимущества метода:

- достоверный результат за две минуты;
- заменяет стандартные биохимические методы;
- высокая воспроизводимость результатов анализа;
- значительная экономия средств и времени;
- единый протокол проведения анализа для любых микроорганизмов.

Области применения:

- диагностика инфекционных заболеваний человека и животных;
- фундаментальные научные исследования в области биологии микроорганизмов;
- фармацевтические исследования в области анализа и сравнения белковых профилей бактериальных штаммов, устойчивых к лекарствам, поиск новых мишеней фармакологического воздействия препаратов;
- сравнение, классификация и стандартизация микробиологических коллекций штаммов микроорганизмов;
- анализ присутствия желательных и нежелательных микроорганизмов на ранних стадиях пищевых производств.



Преимущества метода

- достоверный результат за две минуты;
- заменяет стандартные биохимические методы;
- высокая воспроизводимость результатов анализа;
- значительная экономия средств и времени;
- единый протокол проведения анализа для любых микроорганизмов.

- Экспертная система **Axima@SARAMIS** позволяет идентифицировать до 380 образцов в течение 5 часов работы.
- По состоянию на начало **2009** года накоплены суперспектры более чем для **1600** видов и **230** родов.
- В базу данных **SARAMIS** входит также коллекция первичных масс-спектров микроорганизмов **FingerprintSpectra**, состоящая из более чем 50 000 образцов.

