https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-572-577

Оригинальная статья

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Читать онлайн
Read online

Стрелецкий А.В.[1], Сухина М.А.[1,2], Автономова А.В.[1], Екатеринчева Е.С.[1], Толкачева Л.Р.[1], Грицюк О.В.[1], Новожилов К.А.[1], Водянова М.А.[1], Загайнова А.В.[1]

Микробиологический контроль качества сточной воды методом видовой идентификации микроорганизмов с применением MALDI-TOF MS

[1]ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, 119121, Москва, Россия;

[2]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123154, Москва, Россия

Введение. *Одной из главных задач оказания медицинской помощи при инфекционных заболеваниях является быстрое установление инфекционного агента. Не менее значима задача своевременного принятия профилактических мер в целях предотвращения кишечных инфекций, распространяющихся водным путём. Поэтому ускоренные методы идентификации микроорганизмов позволяют в краткие сроки установить степень микробного загрязнения воды, в том числе сточной, и, следовательно, их потенциальную опасность для водных объектов и здоровья человека.*

Цель работы *– оценить эффективность применения метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации времяпролётной масс-спектрометрии, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI-TOF MS), для идентификации бактерий при проведении микробиологического контроля качества сточной воды.*

Материалы и методы. *В рамках работы проводили бактериологический посев образцов сточной воды на этапе очистки с Курьяновской станции аэрации для определения индикаторных показателей в соответствии с МУ 2.1.5.800-99 «Организация госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод» и МУК 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов», выделенные микроорганизмы идентифицировали с помощью MALDI-TOF MS и проводили секвенирование гена 16S рРНК.*

Результаты. *Были исследованы и идентифицированы 5 штаммов музейных эталонных культур и 22 выделенных из проб сточных вод бактериальных изолята, выращенных на селективных средах (агар Эндо, энтерококк-агар и хромогенных средах), методом MALDI-TOF MS. Правильность видовой идентификации была подтверждена секвенированием специфических участков гена 16S рРНК.*

Ограничения исследования. *Для бактерий рода Salmonella методом MALDI-TOF MS удалось достоверно идентифицировать только род.*

Заключение. *В рутинной практике микробиологических исследований идентификация микроорганизмов основана на определении их культуральных, тинкториальных свойств, а также биохимической активности, определение которых требует больших финансовых и временных затрат. Применение метода MALDI-TOF MS позволяет существенно сократить время идентификации микроорганизмов и делает её возможной уже при появлении видимого роста микроорганизмов.*

Ключевые слова: *сточные воды; обобщённые колиформные бактерии; энтерококки; Escherichia coli; MALDI-TOF MS; секвенирование гена 16S рРНК*

Соблюдение этических стандартов: *исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.*

Для цитирования: Стрелецкий А.В., Сухина М.А., Автономова А.В., Екатеринчева Е.С., Толкачева Л.Р., Грицюк О.В., Новожилов К.А., Водянова М.А., Загайнова А.В. Микробиологический контроль качества сточной воды методом видовой идентификации микроорганизмов с применением MALDI-TOF MS. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(5): 572–577. https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-572-577

Для корреспонденции: *Стрелецкий Алексей Владимирович*, ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, г. Москва. E-mail: streletsky@cspmz.ru

Участие авторов: *Стрелецкий А.В.*, *Сухина М.А.*, *Водянова М.А.*, *Загайнова А.В.* – концепция и дизайн исследования, статистическая обработка, написание текста, редактирование; *Автономова А.В.* – статистическая обработка, написание текста, редактирование; *Екатеринчева Е.С.*, *Толкачева Л.Р.*, *Грицюк О.В.*, *Новожилов К.А.* – сбор и обработка материала, выполнение экспериментальной работы, статистическая обработка, написание текста, редактирование. *Все соавторы* – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование проведено в рамках НИР «Разработка унифицированных методов, включающих отбор проб, для осуществления определения микробиологического и паразитологического загрязнения сточных вод» (шифр «Сточные воды») № 145.001.21.6 от 12.11.2021 г.

Поступила: 15.03.2022 / Принята к печати: 21.04.2022 / Опубликована: 31.05.2022

Aleksey V. Streletskiy[1], Marina A. Sukhina[1,2], Anastasiya V. Avtonomova[1], Ekaterina S. Ekaterincheva[1], Larisa R. Tolkacheva[1], Olga V. Gritsyuk[1], Konstantin A. Novozhilov[1], Mariya A. Vodyanova[1], Angelika V. Zagainova[1]

Microbiological quality control of wastewater by species identification of microorganisms using MALDI-TOF MS

[1]Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121, Russian Federation;

[2]National Medical Research Center of Coloproctology named after A.N. Ryzhikh, 123154, Moscow, Russian Federation

Introduction. *One of the main tasks of medical care for infectious diseases is the rapid identification of an infectious agent.*

The purpose of the study *is to evaluate the effectiveness of the MALDI mass spectrometry for identification bacteria for microbiological control of wastewater quality.*

Materials and methods. *Samples of wastewater samples at the treatment stage from the Kuryanovskaya aeration station were analyzed in accordance with MU 2.1.5.800-99 "Management of state sanitary and epidemiological supervision of wastewater disinfection" by the identification method in accordance with MUK 4.2.1884-04 "Sanitary-microbiological and sanitary – parasitological water analysis of surface water bodies" with application MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequencing.*

Original article

Results. *5 strains of museum reference cultures and 22 bacterial isolates from wastewater samples grown on selective media of Endo, Enterococcus and Chromococcus coliform agar were studied, identified by MALDI-TOF MS, and confirmed by sequencing of specific regions of the 16S rRNA gene in bacteria of the genus Salmonella by MALDI-TOF MS identified only gender.*

Conclusion. *In the routine practice of microbiological research, the identification of microorganisms is based on the determination of their cultural, tinctorial properties, and biochemical activity, the determination of which requires large financial and time costs. The use of the MALDI-TOF MS method makes it possible to reduce the time of identification of a microorganism when visible growth of microorganisms appears.*

Keywords: *wastewater; generalized coliform bacteria; enterococci; Escherichia coli; MALDI-TOF MS; 16S rRNA gene sequencing*

For citation: Streletskiy A.V., Sukhina M.A., Avtonomova A.V., Ekaterincheva E.S., Tolkacheva L.R., Gritsyuk O.V., Novozhilov K.A., Vodyanova, M.A., Zagainova A.V. Microbiological quality control of wastewater by species identification of microorganisms using MALDI-TOF MS. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal*). 2022; 101(5): 572-577. https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-572-577 (In Russian)

For correspondence: *Aleksey V. Streletskiy*, Centre for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks" of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: E-mail: streletsky@cspmz.ru

Information about authors:

Streletskiy A.V., https://orcid.org/0000-0002-8194-1536
Ekaterincheva E.S., https://orcid.org/0000-0002-0260-6677
Vodyanova M.A., https://orcid.org/0000-0003-3350-5753
Avtonomova A.V., https://orcid.org/0000-0001-5098-5379
Sukhina M.A., https://orcid.org/0000-0003-4795-0751
Gritsyuk O.V., https://orcid.org/0000-0001-9728-3075
Zagainova A.V., https://orcid.org/0000-0003-4772-9686

Contribution: *Streletskiy A.V., Sukhina M.A., Vodianova M.A., Zagainova A.V.* – study concept and design, statistical processing, text writing, editing; *Avtonomova A.V.* – statistical processing, text writing, editing; *Ekaterincheva E.S., Tolkacheva L.R., Gritsyuk O.V., Novozhilov K.A.* – collection and processing of material, experimental work, statistical processing, text writing, editing. *All authors* are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.
Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received: March 15, 2022 / Accepted: April 21, 2022 / Published: May 31, 2022

Введение

На сегодняшний день одной из главных задач оказания медицинской помощи при инфекционных заболеваниях является быстрое установление инфекционного агента. Не менее значима задача своевременного принятия профилактических мер в целях предотвращения кишечных инфекций, распространяющихся водным путём. В настоящее время ускоренные методы идентификации микроорганизмов позволяют в краткие сроки установить степень микробного загрязнения воды, в том числе сточной, и, следовательно, их потенциальную опасность для водных объектов и здоровья человека.

Идентификация микроорганизмов представляет собой трудную задачу, которая обусловлена как сложностью в культивировании отдельных групп микроорганизмов, так и ограниченностью применения традиционных методов микробиологических исследований (фенотипических методов бактериологического анализа (по морфологическим, биохимическим признакам, чувствительности к специфическим антибиотикам и т. д.), требующей высокого уровня подготовки кадров [1]. Значительное время проведения анализа (от нескольких часов до нескольких суток) может быть критично в клинической медицине при ведении антибиотикотерапии и поддерживающей терапии, а также при своевременном принятии управленческих решений, предотвращающих заражение нескольких тысяч людей и включающих обеззараживание воды, воздуха, почвы и поверхностей.

В последние годы наибольший интерес вызывает метод масс-спектрометрической видовой идентификации микроорганизмов, основанный на использовании времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией, Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI-TOF MS). Метод относится к «мягким» способам ионизации, что подразумевает возможность получения молекулярных ионов высокомолекулярных биоорганических соединений (белков и пептидов [2], олигонуклеотидов [3], полисахаридов [4]) при импульсном лазерном облучении анализируемого вещества, заключённого в специальном матричном веществе (матрице). Использование времяпролётного масс-анализатора (Time-of-Flight, TOF) позволяет детектировать ионы высоких масс от 1 до 1000 кДа с высоким разрешением [5].

В основе масс-спектрометрии лежит процесс ионизации молекул в газовой фазе с последующим разделением их по отношению массы к заряду при воздействии на них электрического и (или) магнитного поля и последующего детектирования. Для летучих соединений, малых органических молекул в классической аналитической масс-спектрометрии находят применение такие методы, как электронная и химическая ионизация. Однако данные методы неприменимы для анализа высокомолекулярных соединений. С конца 1980-х гг. получил развитие ряд ионизационных методов, позволяющих переводить в газовую фазу биомолекулы высокомолекулярных соединений и получать их стабильные молекулярные ионы, достаточные для регистрации и определения их масс. К настоящему времени наиболее полное развитие получили методы MALDI-TOF MS и ионизация при электрораспылении Electrospray Ionization, ESI MS [6]. В литературных источниках преимущественно описаны исследования, направленные на идентификацию клинически значимых микроорганизмов с применением метода MALDI-TOF MS [7].

При использовании метода MALDI-TOF MS в микробиологии исследуемые образцы культур микроорганизмов смешивают с матрицей. Исследуемый образец представляет собой твёрдый раствор анализируемого микроорганизма в матрице. Матрицей является определённое кислотное органическое ароматическое вещество с гидроксильной или карбоксильной группой, обладающее хорошей растворимостью в органических растворителях и высоким коэффициентом молярной экстинкции в области применяемого лазерного излучения. Состав матрицы может меняться в зависимости от анализируемых биомолекул и типа используемого лазера. Наиболее часто используемые матрицы – α-циано-4-гидроксикоричная кислота и 2,5-дигидроксибензойная кислота.

Высокую эффективность для детекции биомаркеров белков у микроорганизмов показала α-циано-4-гидроксикоричная кислота [8–11], а преимущества при детекции гликопептидов и гликопротеинов – 2,5-дигидроксибензойная кислота [12, 13].

На сегодняшний день MALDI-TOF MS находит применение в диагностике для идентификации различных родов, видов и даже штаммов микроорганизмов. Идентификация происходит благодаря возможности регистрации спектра ионов маркерных рибосомальных белков, которые присутствуют в клетке в большом количестве и легко ионизируются под воздействием ультрафиолетового лазерного излучения в присутствии специального матричного вещества. Уникальность применения данного метода заключается в том, что сам анализируемый образец представляет собой отдельно взятую колонию, отсутствует необходимость в проведении рутиной

https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-572-577

Оригинальная статья

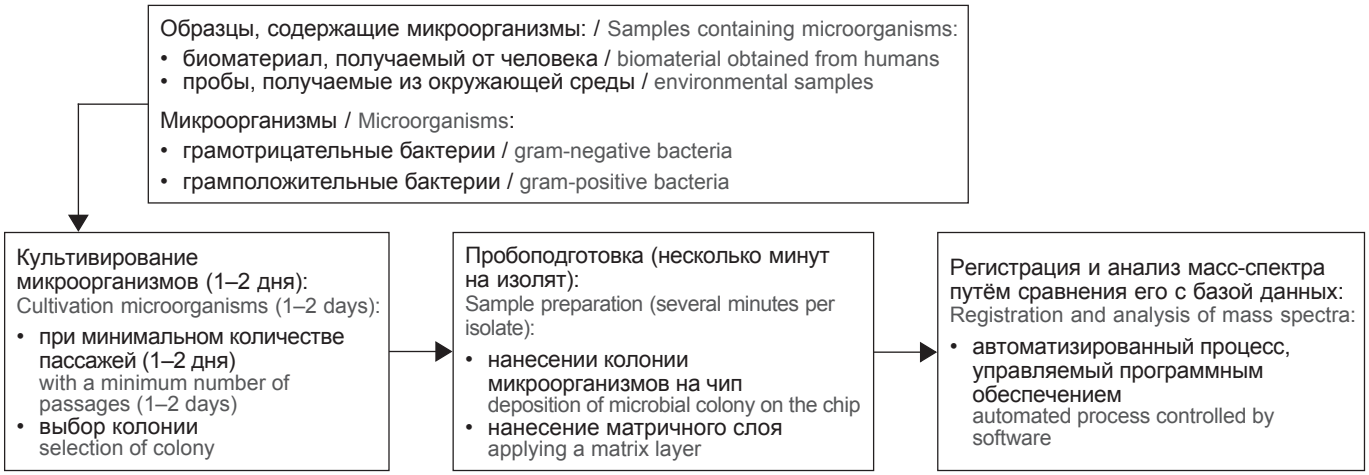


Рис. 1. Идентификация микроорганизмов.

Fig. 1. Identification of microorganisms.

пробоподготовки, связанной с экстракцией, разделением анализируемых веществ (маркерных или рибосомальных белков) и среды. Благодаря этому время пробоподготовки и регистрации масс-спектра белков исследуемой колонии бактерии занимает несколько минут. Получаемый масс-спектр положительных ионов маркерных белков представляет собой определённый строго воспроизводимый набор пиков и является «отпечатком пальца» (белковым профилем) для микроорганизмов, по которому можно определить их род и вид путём сравнения по базе данных известных масс-спектров маркерных белков достоверно идентифицированных микроорганизмов.

Цель работы – оценить эффективность применения метода MALDI-TOF MS для идентификации бактерий при проведении микробиологического контроля качества сточной воды.

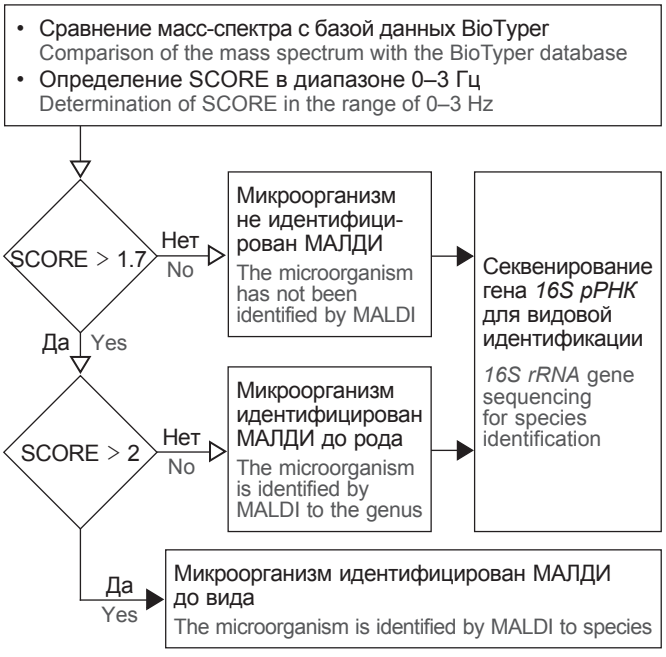


Рис. 2. Анализ получаемого масс-спектра для идентификации микроорганизмов.

Fig. 2. Analysis of the mass spectrum obtained for identification of microorganisms.

Материалы и методы

Идентификация микроорганизмов проводится в несколько этапов: культивирование, пробоподготовка и масс-спектральный анализ (рис. 1).

На первом этапе проводили бактериологический посев образцов сточной воды на этапе очистки с Курьяновской станции аэрации для определения индикаторных показателей в соответствии с МУ 2.1.5.800-99 «Организация госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод», определяли общие (обобщённые) колиформные бактерии, *E. coli*, фекальные стрептококки методами в соответствии с МУК 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов». Для сопоставления полученных результатов после идентификации методом MALDI-TOF MS к обобщённым колиформным бактериям относили бактерии пяти семейств: *Enterobacteriaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae*, *Yersiniaceae*, *Erwiniaceae*.

На втором этапе проводили пробоподготовку образца для проведения масс-спектрального анализа. Из посева бактериологической петлёй брали единичные колонии микроорганизмов и переносили на металлический чип. Для экстракции белковых молекул к биологическому образцу добавляли 1 мкл раствора 70%-й муравьиной кислоты. Затем на высохший слой образца наносили каплю перенасыщенного раствора матрицы, растворённой в 70%-м ацетонитриле и 2,5%-й трифторуксусной кислоте. В нашем случае в качестве матрицы использовали α-циано-4-гидроксикоричную кислоту.

На третьем этапе проводили масс-спектрометрический анализ на оборудовании Microflex (Bruker Daltonics, Германия). Анализ проводили путём регистрации усреднённого масс-спектра положительных ионов после нескольких сотен лазерных импульсов. Одновременно с получением данных о распределении ионов проходили их обработка и анализ с помощью программного пакета MALDI BioTyper v. 3 (Bruker Daltoniks, Германия). Анализ, проводимый BioTyper, заключался в последовательном сравнении полученного масс-спектра с базой данных эталонных спектров известных микроорганизмов (рис. 2). При совпадении уникального набора пиков ионов анализируемого и эталонного образцов выдавался результат об отнесении исследуемого образца микроорганизма к определённому роду и виду. В масс-спектрометрии идентификация носит вероятностный характер, поэтому в зависимости от качества и точности соответствия спектров исследуемого образца и его эталона программа каждому

Original article

Таблица 1 / Table 1

Видовая идентификация музейных эталонных микроорганизмов
Species identification reference strains of microorganisms

Наименование штамма Name of strain	Идентификация методом MALDI-TOF MS MALDI-TOF MS identification	SCORE	Вид микроорганизма, определённый секвенированием гена *16S pPHK* Species of microorganism identified by *16S rRNA* sequencing
Escherichia coli ATCC 25922	*Escherichia coli* ATCC 25922	2.15–2.290	*Escherichia coli*
Staphylococcus aureus ATCC 29213	*Staphylococcus aureus* ATCC 29213	2.07–2.120	*Staphylococcus aureus*
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853	1.58–2.03	*Pseudomonas aeruginosa*
Enterococcus faecalis ATCC 29212	*Enterococcus faecalis* ATCC 29212	1.71–2.02	*Enterococcus faecalis*
Salmonella enterica ATCC 13311	*Salmonella*	2.00–2.20	*Salmonella enterica*

идентифицируемому микроорганизму указывает значение SCORE (от 0 до 3 единиц). Предполагается, что при SCORE больше 2 вероятность правильной идентификации вида является высокой. При значениях SCORE в диапазоне от 1,7 до 2 культура считалась идентифицированной только до рода. При значении SCORE менее 1,7 считается, что микроорганизм не идентифицирован.

Для подтверждения правильности видовой идентификации бактерий методом масс-спектрометрии проводили анализ данных методом секвенирования последовательности гена 16S рибосомальной РНК. При выделении ДНК бактерии осаждали центрифугированием, удаляли супернатант и ресуспендировали бактериальный осадок в 250 мкл ТЕ-буфера, содержащего 20 мг/мл лизоцима. Инкубировали в течение 1 ч при температуре плюс 37 °С, затем добавляли 125 мкл 3-кратного буфера для лизиса протеиназой К (рабочая концентрация 200 мкг/мл, 1,5% SDS, 100 мМ NaCl), перемешивали и инкубировали в течение 30 мин при температуре плюс 60 °С. Для грамположительных бактерий реакционную смесь дополнительно обрабатывали интенсивным встряхиванием с циркониевыми шариками размером 0,2 мм на гомогенизаторе Precellys (Bertin Technologies, Франция) со скоростью вращения 6000 об./мин. После центрифугирования 400 мкл лизированных бактерий переносили в новую пробирку и дальнейшее выделение выполняли набором QIAamp DNA Kit (QIAGEN, Германия) на фильтровальных колонках QIAamp Mini spin colum в соответствии с протоколом, начиная с этапа добавления 400 мкл AL буфера и инкубации в течение 10 мин при температуре плюс 70 °С. Элюцию с колонок проводили прилагаемым буфером АЕ в объёме 120 мкл. Концентрацию бактериальной ДНК определяли на микрофлуориметре Qubit-2 (ThermoFisher Scientific, США) с реагентами Qubit dsDNA HS Assay Kit. Для секвенирования использовали два фрагмента ДНК: первый – ампликон длиной ~440 п.н., соответствующий позициям 339–785 гена 16S рРНК, второй – ампликон длиной ~1340 п.н., соответствующий позициям 42–1380 гена 16S рРНК. Амплификацию проводили с использованием детектирующего амплификатора ДТпрайм (производство ООО «НПО ДНК-Технология»). Оценку качества полученных ампликонов производили в 2%-м агарозном геле. Секвенирование проводили на приборе 3130 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific, США) с использованием набора BigDye™ Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit согласно протоколу производителя. Определение видовой принадлежности проводили с использованием программного пакета BLAST.

Результаты

Были исследованы 5 штаммов музейных эталонных культур (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Salmonella enterica* ATCC 13311) и 22 бактериальных изолята, относящихся к видам *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica*, которые были выделены из проб сточных вод и выращены на селективных средах: агаре Эндо, энтерококк-агаре и хромогенном агаре Chromocult® Coliform Agar.

Для большинства изолятов при идентификации методом MALDI-TOF MS получены высокие значения показателя SCORE (от 2 до 2,9), что позволило их идентифицировать до вида с определённой степенью достоверности. Исключение составила *Salmonella*, которая была идентифицирована только до рода. Результаты видовой идентификации музейных эталонных микроорганизмов представлены в табл. 1. Результаты родовой и видовой идентификации изолятов, выделенных из сточных вод, представлены в табл. 2.

Таблица 2 / Table 2

Результаты видовой идентификации путем секвенирования гена *16S pPHK*
Results of species identification of microorganism identified by *16S rRNA* sequencing

Видовая идентификация по результатам Species identification of microorganism identified by	
MALDI-TOF MS с подтверждением биохимического профиля MALDI-TOF-MS with biochemical confirmation	секвенирования гена *16S pPHK* *16S rRNA* sequencing
Raoultella ornithinolytica	*Raoultella ornithinolytica*
Enterococcus faecium	*Enterococcus faecium*
Enterococcus faecalis	*Enterococcus faecalis*
Streptococcus lutetiensis	*Streptococcus lutetiensis*
Pseudomonas aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
Aeromonas hydrophila	*Aeromonas hydrophila*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Aeromonas caviae	*Aeromonas caviae*
Klebsiella pneumoniae	*Klebsiella pneumoniae*
Klebsiella oxytoca	*Klebsiella oxytoca*
Klebsiella granulomatis	*Klebsiella granulomatis*
Klebsiella variicola	*Klebsiella variicola*
Citrobacter freundii	*Citrobacter freundii*
Enterobacter cloacae	*Enterobacter cloacae*
Hafnia alvei	*Hafnia alvei*
Serratia marcescens	*Serratia marcescens*
Proteus mirabilis	*Proteus mirabilis*
Enterobacter aerogenes	*Enterobacter aerogenes*
Pseudomonas fluorescens	*Pseudomonas fluorescens*
Pseudomonas putida	*Pseudomonas putida*
Enterococcus durans	*Enterococcus durans*
Enterococcus hirae	*Enterococcus hirae*

https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-572-577

Оригинальная статья

Практически во всех случаях секвенирование гена *16S pPHK* подтвердило правильность результатов видовой идентификации микроорганизмов, результаты которой отражены в табл. 1 и 2. Для всех изолятов были корректно определены род и вид микроорганизмов. Расхождения в идентификации наблюдались в случае обнаружения *Salmonella*, которые методом MALDI-TOF MS определялись только до рода. Результаты идентификации музейных культур представлены в табл. 2 на рис. 3–5 (см. на вклейке).

На примере рис. 3 рассмотрим масс-спектр положительных ионов рибосомальных белков культуры *Escherichia coli*, который сравнивается с эталонным масс-спектром базы данных BioTyper. Пики ионов исследуемого образца, совпадающие с эталонным, окрашены в зелёный цвет. Полученный SCORE сравнения образца с эталонным составил 2,48 ед. Уникальный набор пиков в области 2–12 кДа преимущественно совпадает с эталонным. Необходимо отметить, что при регистрации масс-спектра происходит отсечение пиков матричных ионов, которые лежат в области менее *m/z* 500. Наблюдаемые ионы, выделенные красным цветом, не лежат в области, соответствующей эталону, что может быть объяснено наличием незначительной контаминации. Пики, выделенные жёлтым цветом, соответствуют эталонным, но с небольшим расхождением по массе ионов. Последнее может быть вызвано как нестабильностью ионного тока при масс-спектральном анализе MALDI-TOF MS, так и неточностью калибровки по массе.

В рутинной практике санитарных микробиологических исследований идентификация микроорганизмов основана на изучении биохимических свойств бактерий. Для этого на среде Эндо учитывают следующие характеристики при отборе колоний: оксидазоотрицательные, грамотрицательные, лактозоположительные и лактозоотрицательные бактерии, растущие при температуре плюс 37 ± 1 °С. Для ускорения идентификации выделенных микроорганизмов при проведении санитарно-микробиологического исследования воды часто используют хромогенные среды, на которых определяют β-галаксидазную активность энтеробактериий, в том числе замедленно сбраживающих лактозу (некоторые штаммы эшерихий, клебсиелл, цитробактеров и др.). Например, на агаре Chromocult® Coliform Agar бактерии окрашиваются следующим образом: белые – сальмонеллы, синие и бирюзовые – *E. coli*, розовые и фиолетовые – глюкозоположительные бактерии, обладающие ферментом β-D-галаксидазой (рис. 6, см. на вклейке). На энтерококк-агаре энтерококк окрашиваются (с диаметром и без него) в красный цвет.

У 22 изолятов (см. табл. 2) методом секвенирования гена 16S pPHK была подтверждена правильность результатов идентификации методом MALDI-TOF MS. Результаты идентификации изолятов, выделенных из сточных вод, представлены в табл. 2 и на рис. 7–13 (см. на вклейке). При отборе штаммов для анализа использовали следующие критерии: низкий показатель SCORE при видовой идентификации на MALDI-TOF-масс-спектрометре Microflex (Bruker, Германия) (SCORE < 1,7) либо (при правильном определении до рода, но наличии нескольких вариантов видовой идентификации одновременно) при значениях SCORE ⩾ 1,7.

В соответствии с МУК 4.2.1884-04 при определении общих (обобщённых) колиформных бактерий при проведении санитарно-микробиологического контроля качества сточных вод посевы инкубируют при температуре плюс 37 ± 1 °С в течение 24 ч, далее проводят учёт результатов только лактозоположительных колоний – красных с металлическим блеском или без него, с отпечатком или без отпечатка. Лактозоотрицательные колонии остаются вне учёта. В документе оговариваются другие спорные моменты, которые могут возникнуть при идентификации выросших лактозоположительных, грамотрицательных колоний, что может привести к получению окончательного результата ещё через 48 ч. Поскольку колонии для идентификации выбирает исследователь, полученный результат носит субъективный характер.

При определении в пробах воды энтерококков в соответствии с МУК 4.2.1884-04 фильтры с посевами помещают на азидную среду и инкубируют при температуре плюс 37 ± 1 °С в течение 48 ч, затем для подтверждения изолированные колонии пересевают секторами на солевой агар с ТТХ и после 24–48 ч инкубации учитывают результаты. Эти методы трудоёмки, требуют больших финансовых и временных затрат в отличие от метода MALDI-TOF MS, который позволил идентифицировать 95,4% изолированных колоний с точностью до вида и 100% – с точностью до рода. Собранные в процессе анализа спектры исследуемых микроорганизмов сравниваются с референтными спектрами постоянно пополняемой базы данных. При идентификации делается вывод о таксономической принадлежности исследуемого объекта, с помощью которой микроорганизмы относят к соответствующей индикаторной группе.

Обсуждение

Незначительное количество расходных материалов и реагентов при наличии многоразовых пластин делает технологию MALDI-TOF MS не только экономически обоснованной, но и экологичной, особенно в сравнении с традиционными автоматическими бактериологическими анализаторами, работающими на принципах фенотипической диагностики. В рутинной практике микробиологических исследований идентификация микроорганизмов основана на определении их культуральных, тинкториальных свойств, а также биохимической активности, определение которых требует больших финансовых и временных затрат. Применение метода MALDI-TOF MS позволяет сократить время идентификации микроорганизма при появлении видимого роста, то есть провести идентификацию культуры через 24–48 ч.

Сравнение результатов видовой идентификации бактериальных микроорганизмов, выращенных на селективных средах Эндо, энтерококк-агаре и хромогенном агаре Chromocult® Coliform Agar, принадлежность которых к индикаторной группе подтверждена в соответствии с МУК 4.2.1884-04, показало полное соответствие результатам, полученным методом MALDI-TOF MS. Показатель SCORE от 2 до 2,9 позволил идентифицировать данные микроорганизмы до вида с определённой степенью достоверности и секвенированием специфических участков гена 16S pPHK.

Полученные данные однозначно показывают, что MALDI-TOF MS является быстрым, наглядным и сравнительно доступным методом видовой идентификации микроорганизмов и обладает высокой чувствительностью (предел измерения 10^4–10^5 клеток). Пробоподготовка не зависит от типа среды или культуры и занимает не более 5 мин (на один образец).

Метод MALDI-TOF MS является быстрым в исполнении, регистрация спектра образцов может проходить автоматически с заранее заявленным алгоритмом записи спектров. При этом для регистрации спектра одного образца достаточно одной минуты. На примере данной работы, а также на основании литературных данных [14–16] можно говорить о высокой точности (более 95%) проводимой видовой идентификации микроорганизмов.

Наблюдаемые ограничения метода: для бактерий рода *Salmonella* видовая идентификация не была проведена корректно, что требует дополнительных исследований, включающих детальный анализ масс-спектрального распределения ионов рибосомальных белков. Вполне возможно, что неточность при получении результатов могла быть вызвана контаминацией, инструментальными особенностями исполнения метода, необходимостью в наполнении и модифицировании базы данных микроорганизмов.

Original article

Заключение

Метод идентификации микроорганизмов MALDI-TOF MS представляет собой уникальный высокоэффективный, точный и вместе с тем низкозатратный метод, получивший в последние годы широкое распространение в клинической микробиологии и, несомненно, востребованный и в санитарной микробиологии. Простота пробоподготовки позволяет применять метод в рутинных исследованиях. Появление новых приложений, позволяющих усовершенствовать диагностику инфекций и определить резистентность возбудителей к антибиотикам, делает этот метод особенно привлекательным для многопрофильных стационаров [17] и применения в рутинных санитарно-эпидемиологических исследованиях.

Развитие MALDI-TOF MS революционно изменило подход к рутинной идентификации микроорганизмов в микробиологических лабораториях. Этот метод характеризуется высокой производительностью, эффективностью и низкой себестоимостью. Использование стандартизированных методик MALDI-TOF MS позволяет точно идентифицировать до вида большинство клинически значимых бактерий и микроорганизмов, являющихся маркерными в санитарной микробиологии. При применении этой технологии анализируются спектральные характеристики значительного числа белковых молекул, преимущественно рибосомальных белков, являющихся уникальным белковым спектром («отпечатком пальца») конкретного микроорганизма. Имеющаяся в программном обеспечении база спектров грибов позволяет проводить надёжную рутинную идентификацию дрожжеподобных грибов с использованием MALDI-TOF MS.

Литература / References

1. Buszewski B., Rogowska A., Pomastowski P., Złoch M., Railean-Plugaru V. Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *J. AOAC Int.* 2017; 100(6): 1607–23. https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0207
2. Domon B., Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science.* 2006; 312(5771): 212–7. https://doi.org/10.1126/science.1124619
3. Douthwaite S., Kirpekar F. Identifying modifications in RNA by MALDI mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 2007; 425: 3–20. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(07)25001-3
4. Harvey D.J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: an update for 2015–2016. *Mass Spectrom. Rev.* 2021; 40(4): 408–565. https://doi.org/10.1002/mas.21651
5. Radionova A., Filippov I., Derrick P.J. In pursuit of resolution in time-of-flight mass spectrometry: A historical perspective. *Mass Spectrom. Rev.* 2016; 35(6): 738–57. https://doi.org/10.1002/mas.21470
6. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989; 246(4926): 64–71. https://doi.org/10.1126/science.2675315
7. De Carolis E., Vella A., Vaccaro L., Torelli R., Posteraro P., Ricciardi W., et al. Development and validation of an in-house database for matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based yeast identification using a fast protein extraction procedure. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(5): 1453–8. https://doi.org/10.1128/jcm.03355-13
8. Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., Matsuo T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988; (8): 151–3.
9. Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* 1985; 57(14): 2935–9.
10. Fenselau C., Demirev P.A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2001; 20(4): 157–71. https://doi.org/10.1002/mas.10004
11. Vaidyanathan S., Winder C.L., Wade S.C., Kell D.B., Goodacre R. Sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of whole bacterial cells and the detection of high mass (>20 kDa) proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002; 16(13): 1276–86. https://doi.org/10.1002/rcm.713
12. Giebel R., Worden C., Rust S.M., Kleinheinz G.T., Robbins M., Sandrin T.R. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv. Appl. Microbiol.* 2010; 71: 149–84. https://doi.org/10.1016/s0065-2164(10)71006-6
13. Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012; 36(2): 380–407. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x
14. Hrabák J., Chudácková E., Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(1): 103–14. https://doi.org/10.1128/cmr.00058-12
15. Huang A.M., Newton D., Kunapuli A., Gandhi T.N., Washer L.L., Isip J., et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57(9): 1237–45. https://doi.org/10.1093/cid/cit498
16. Kiehntopf M., Schmerler D., Brunkhorst F.M., Winkler R., Ludewig K., Osterloh D., et al. Mass spectrometry-based protein patterns in the diagnosis of sepsis / systemic inflammatory response syndrome. *Shock.* 2011; 36(6): 560–9. https://doi.org/10.1097/shk.0b013e318237ea7c
17. Van Belkum A., Welker M., Erhard M., Chatellier S. Biomedical mass spectrometry in today's and tomorrow's clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(5): 1513–7. https://doi.org/10.1128/jcm.00420-12

К статье А.В. Стрелецкого и соавт.

To the article by A.V. Streletskiy et al.

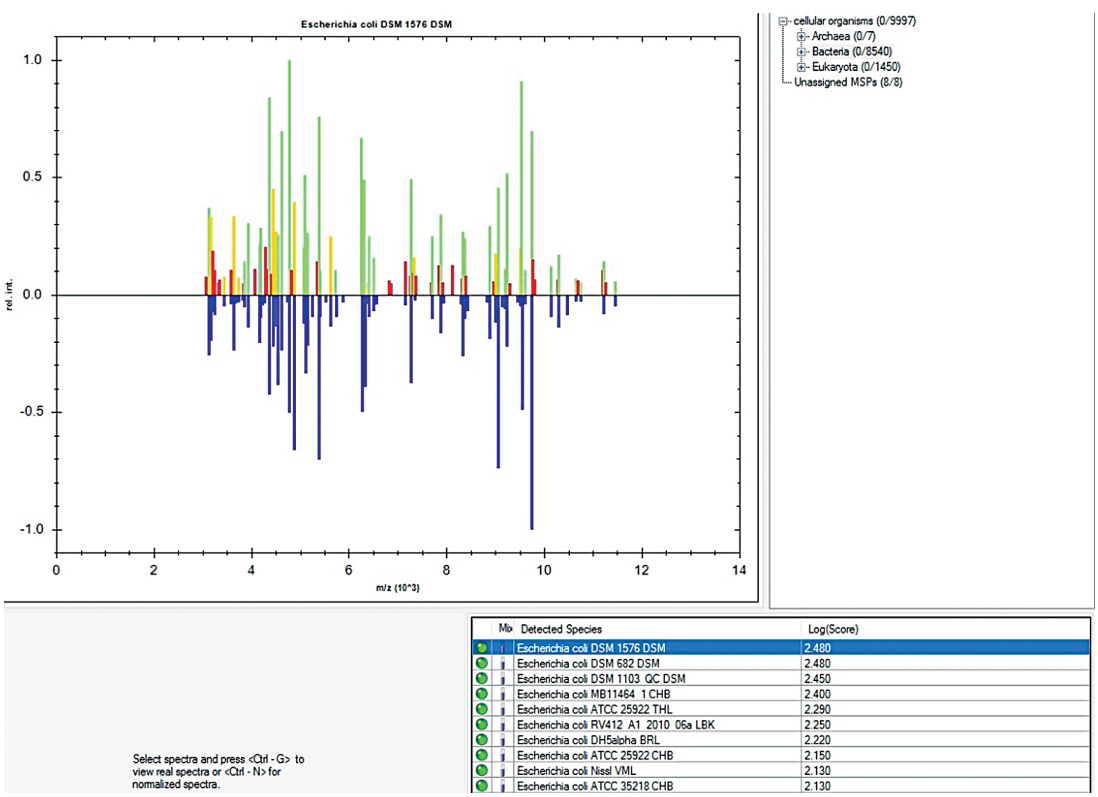


Рис. 3. Подтверждение идентификации микроорганизмов, выделенных из сточных вод, с применением MALDI-TOF MS (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Fig. 3. Confirmation of identification of microorganisms separated from wastewater using MALDI-TOF MS (*Escherichia coli* ATCC 25922).

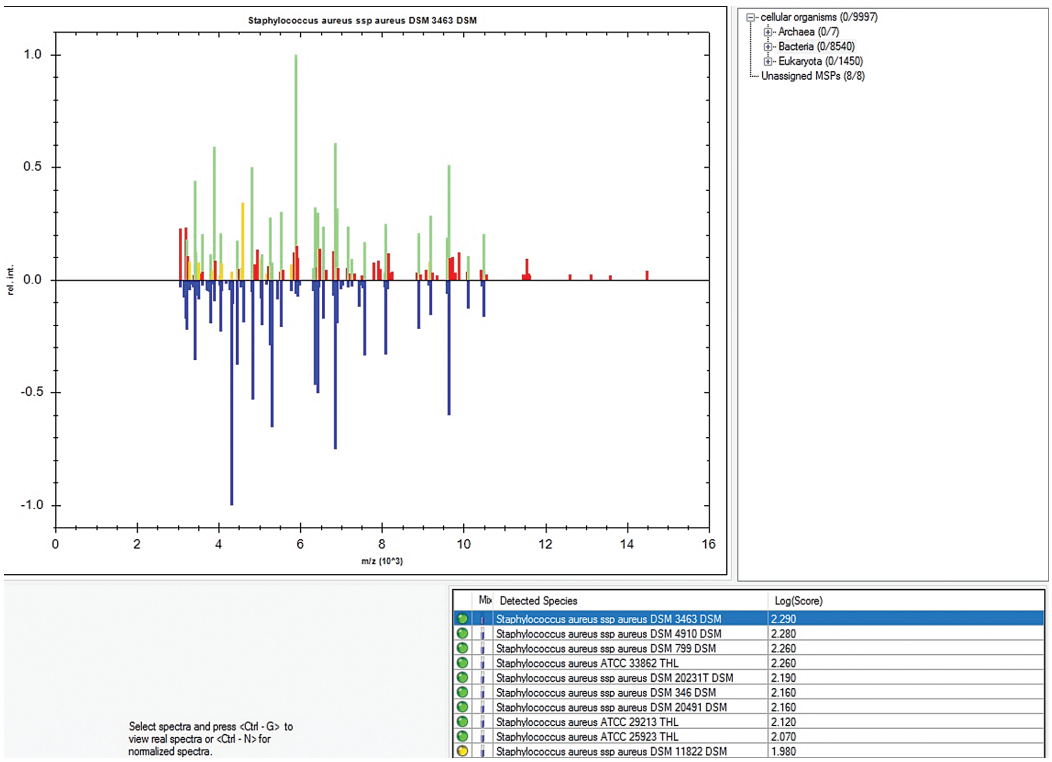


Рис. 4. Подтверждение идентификации микроорганизмов, выделенных из сточных вод, с применением MALDI-TOF MS (*Staphylococcus aureus* ATCC 2921).

Fig. 4. Confirmation of identification of microorganisms separated from wastewater using MALDI-TOF MS (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213).

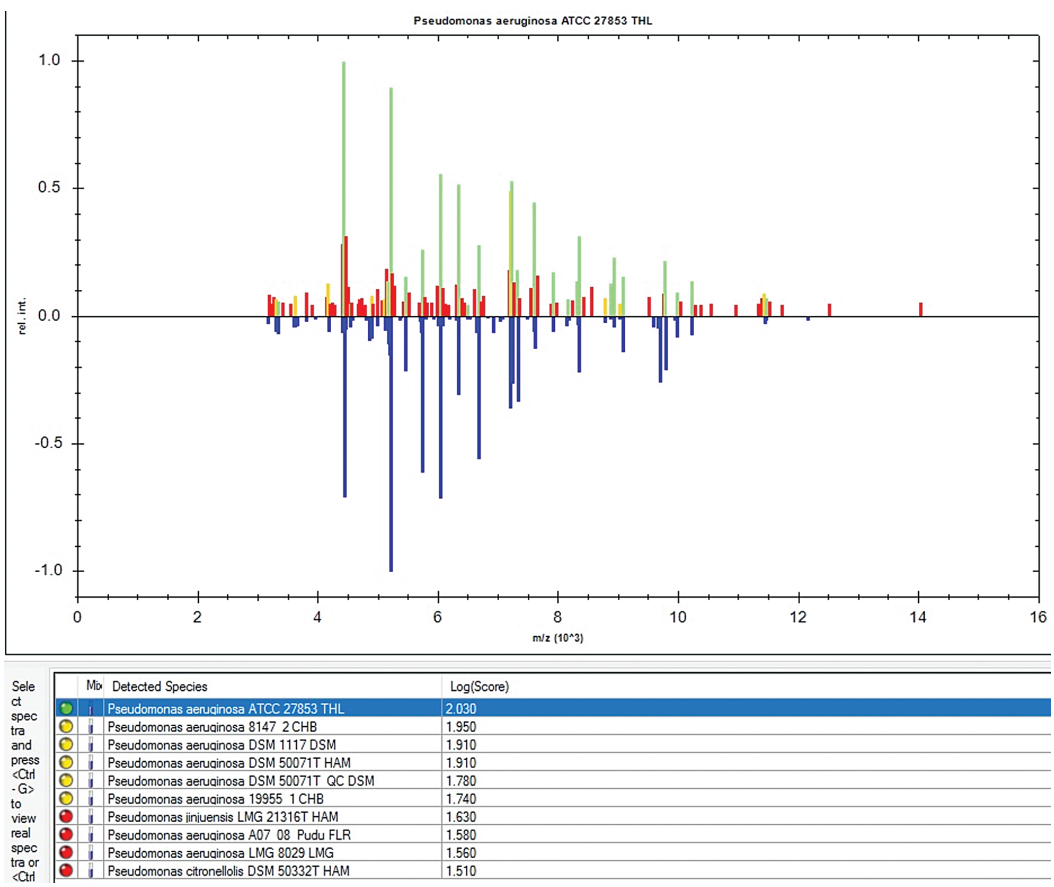


Рис. 5. Подтверждение идентификации микроорганизмов, выделенных из сточных вод, с применением MALDI-TOF MS (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Fig. 5. Confirmation of identification of microorganisms separated from wastewater using MALDI-TOF MS (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

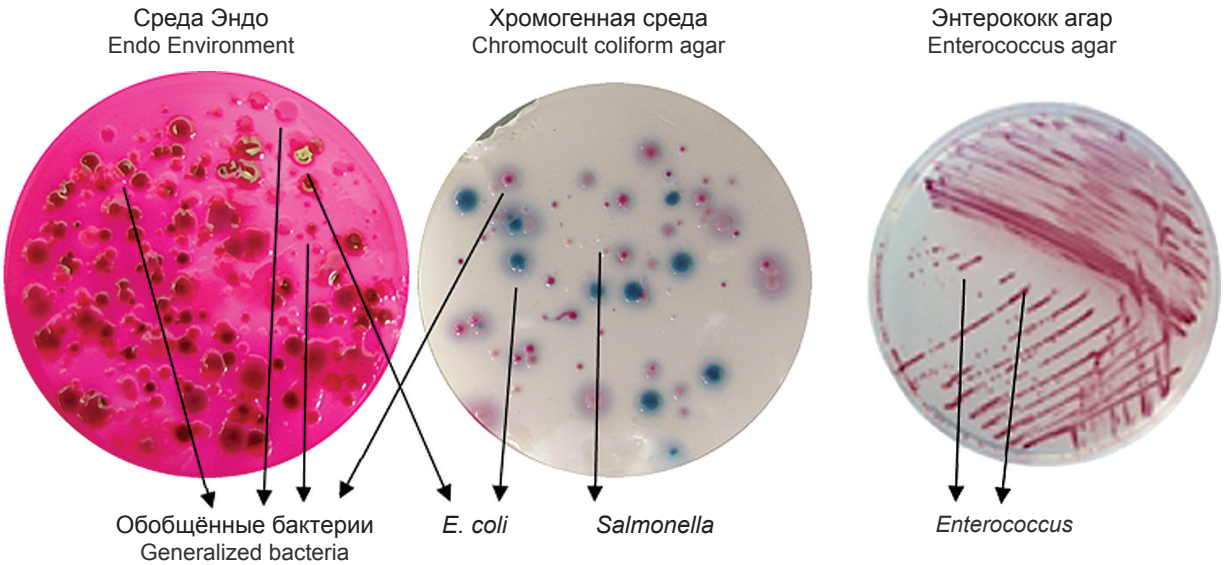


Рис. 6. Рост микроорганизмов на селективных средах: Эндо, энтерококк и хромогенных средах (Chromocult Coliform Agar).
Fig. 6. Growth of microorganisms in selective culture media: Endo, enterococcus and chromogenic media (Coprocult Coliform Agar)

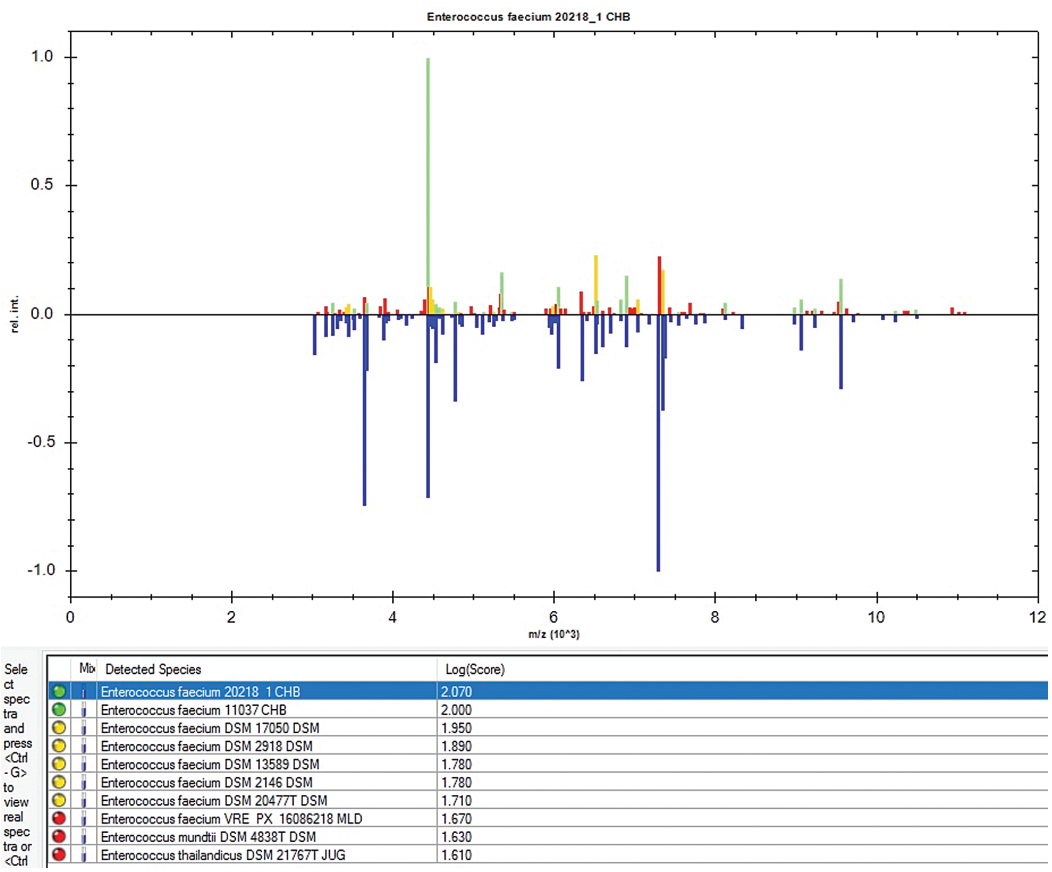
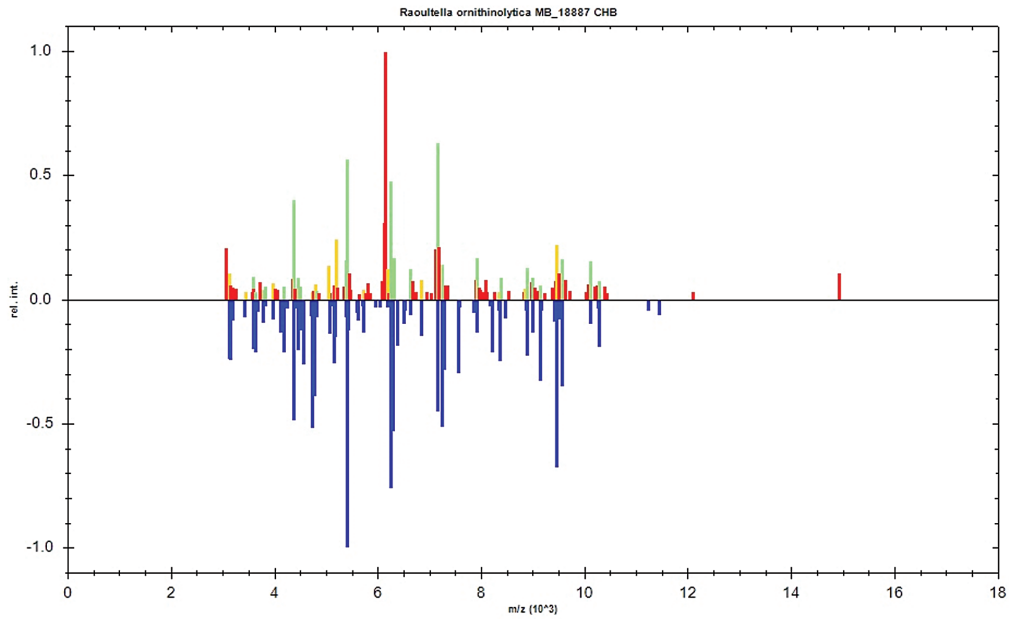
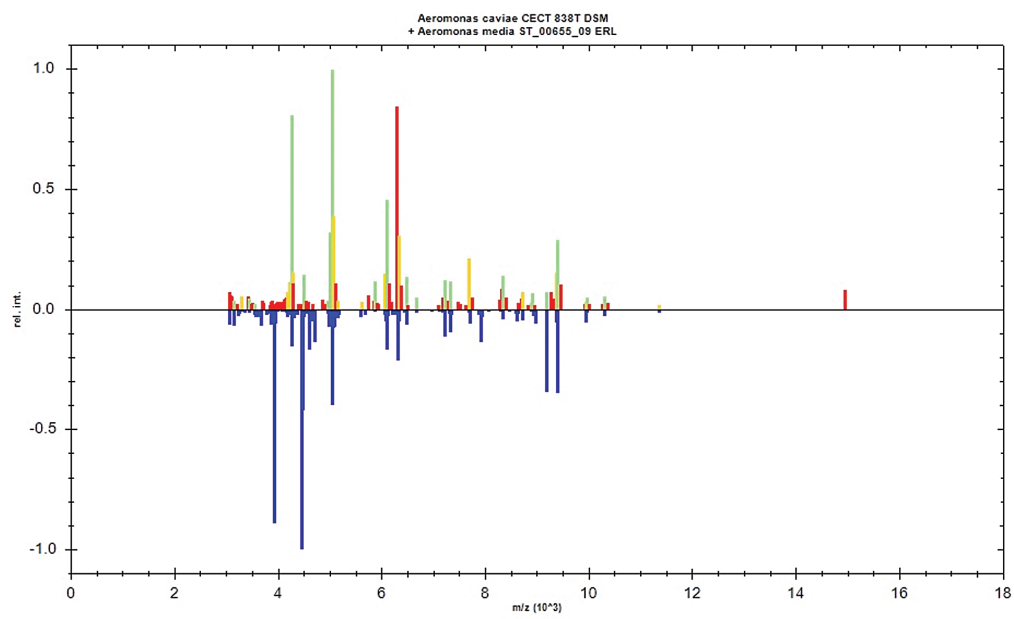


Рис. 7. Подтверждение идентификации микроорганизмов, выделенных из сточных вод, с применением MALDI-TOF MS (*Enterococcus faecium*).
Fig. 7. Confirmation of identification microorganisms separated from wastewater using MALDI-TOF MS (*Enterococcus faecium*).



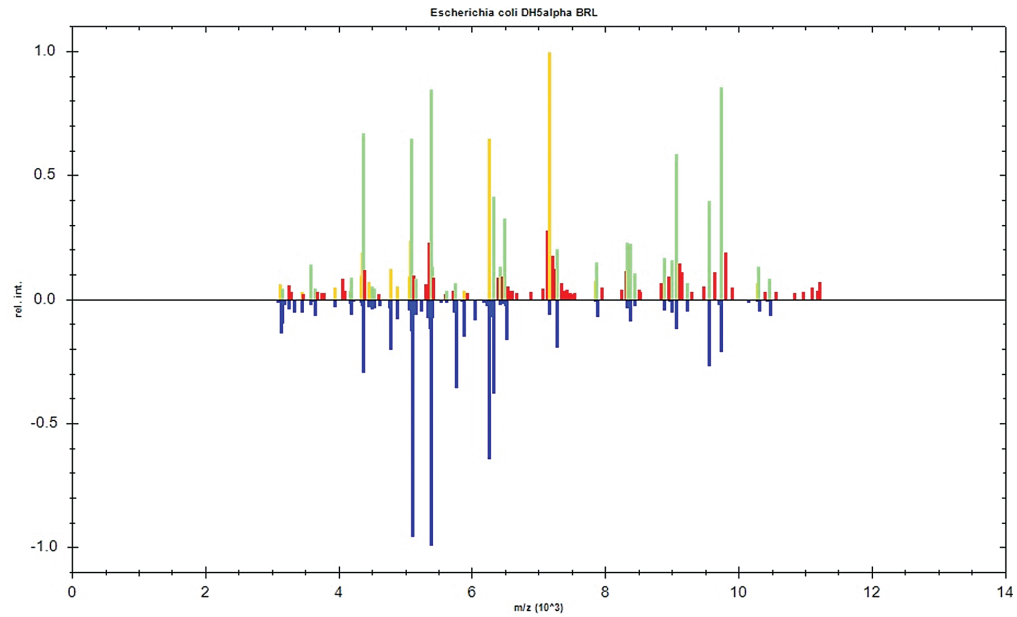
Mb	Detected Species	Log(Score)
	Raoultella ornithinolytica MB_18887 CHB	2.100
	Raoultella ornithinolytica DSM 7464T DSM	1.980
	Raoultella ornithinolytica MHNC_57_7 ERL	1.960
	Raoultella ornithinolytica VA10895_09 ERL	1.900
	Raoultella ornithinolytica CCUG 52805 CCUG	1.890
	Raoultella ornithinolytica MHNC_19_3 ERL	1.890
	Raoultella ornithinolytica MHNC_46_4 ERL	1.880
	Raoultella terrigena VA5551_09 ERL	1.880
	Raoultella planticola VA3440_3_09 ERL	1.860
	Raoultella ornithinolytica VA00837_09 ERL	1.860

Рис. 8. Подтверждение идентификации микроорганизмов, выделенных из сточных вод, с применением MALDI TOF MS (*Raoultella ornithinolytica*).
Fig. 8. Confirmation of identification microorganisms isolated from wastewater using MALDI-TOF MS (*Raoultella ornithinolytica*).



Mb	Detected Species	Log(Score)
	Aeromonas caviae CECT 838T DSM	2.050
	Aeromonas caviae CECT 838T DSM	1.680
	Aeromonas bestiarum CECT 4227T DSM	1.640
	Aeromonas veronii CECT 4199T DSM	1.610
	Aeromonas media ST_00655_09 ERL	1.600
	Aeromonas hydrophila CECT 839T DSM	1.590
	Aeromonas veronii CECT 5761T DSM	1.570
	Aeromonas ichthiosmia DSM 6393T HAM	1.560
	Aeromonas media DSM 4881T HAM	1.550
	Aeromonas jandaei CECT 4228T DSM	1.550

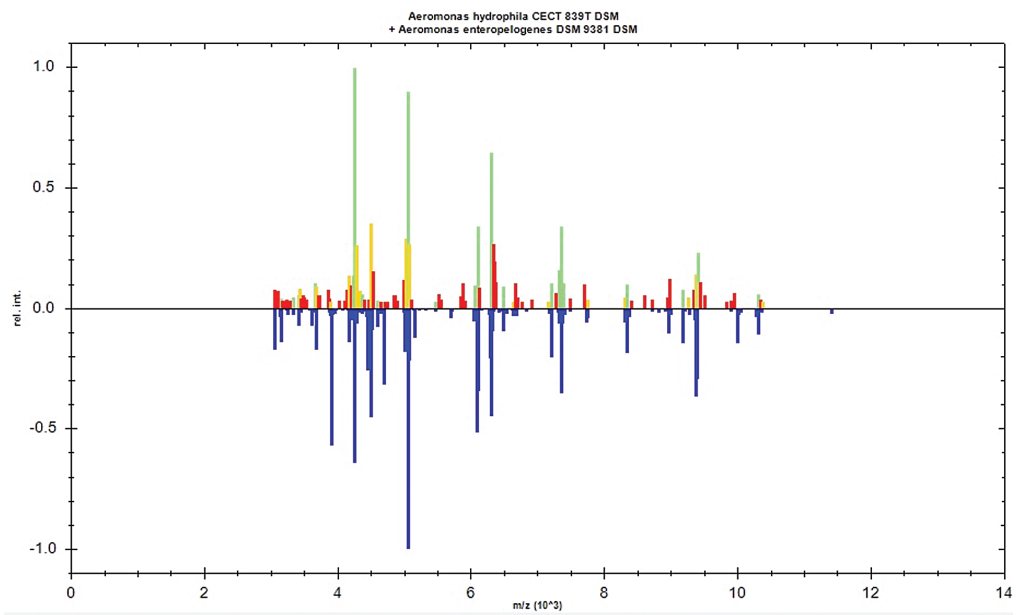
Рис. 9. Подтверждение идентификации микроорганизмов, выделенных из сточных вод, с применением MALDI-TOF MS (*Aeromonas caviae*).
Fig. 9. Confirmation of identification microorganisms separated from wastewater using MALDI-TOF MS (*Aeromonas caviae*).



Select spectra and press <Ctrl-G> to view real spectra or <Ctrl

Mo	Detected Species	Log(Score)
	Escherichia coli DH5alpha BRL	2.240
	Escherichia coli DSM 682 DSM	2.020
	Escherichia coli MB11464_1 CHB	1.990
	Escherichia coli ATCC 25922 THL	1.930
	Escherichia coli DSM 1576 DSM	1.910
	Escherichia coli ESBL_EA_RSS_1528T CHB	1.910
	Escherichia coli RV412_A1_2010_06a LBK	1.880
	Escherichia coli DSM 30083T HAM	1.830
	Escherichia coli W3350 MMG	1.810
	Escherichia coli Nissl VML	1.800

Рис. 10. Подтверждение идентификации микроорганизмов, выделенных из сточных вод, с применением MALDI-TOF MS (*Escherichia coli*).
Fig. 10. Confirmation of identification microorganisms separated from wastewater using MALDI-TOF MS (*Escherichia coli*)



Select spectra and press <Ctrl-G> to view real spectra or <Ctrl

Mo	Detected Species	Log(Score)
	Aeromonas hydrophila CECT 839T DSM	2.110
	Aeromonas hydrophila CECT 839T DSM	1.920
	Aeromonas caviae CECT 838T DSM	1.850
	Aeromonas veronii CECT 5761T DSM	1.790
	Aeromonas jandaei CECT 4228T DSM	1.760
	Aeromonas hydrophila ssp hydrophila LMG 21108 LMG	1.730
	Aeromonas veronii CECT 4257T DSM	1.720
	Aeromonas veronii 0807M090438 IBS	1.690
	Aeromonas caviae 60 PIM	1.630
	Aeromonas enteropelogenes DSM 9381 DSM	1.610

Рис. 11. Подтверждение идентификации микроорганизмов, выделенных из сточных вод, с применением MALDI-TOF MS (*Aeromonas hydrophila*).
Fig. 11. Confirmation of identification microorganisms separated from wastewater using MALDI-TOF MS (*Aeromonas hydrophila*).

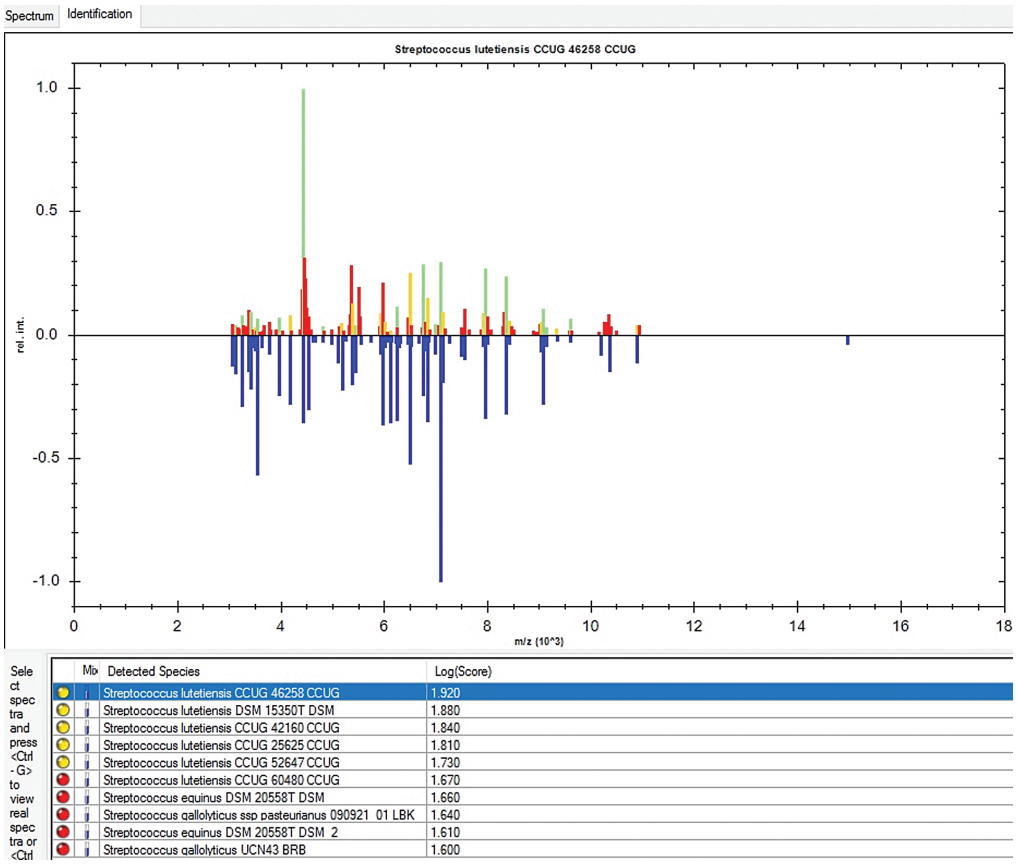


Рис. 12. Подтверждение идентификации микроорганизмов, выделенных из сточных вод, с применением MALDI-TOF MS (*Streptococcus lutetiensis*).
Fig. 12. Confirmation of identification microorganisms separated from wastewater using MALDI-TOF MS (*Streptococcus lutetiensis*).

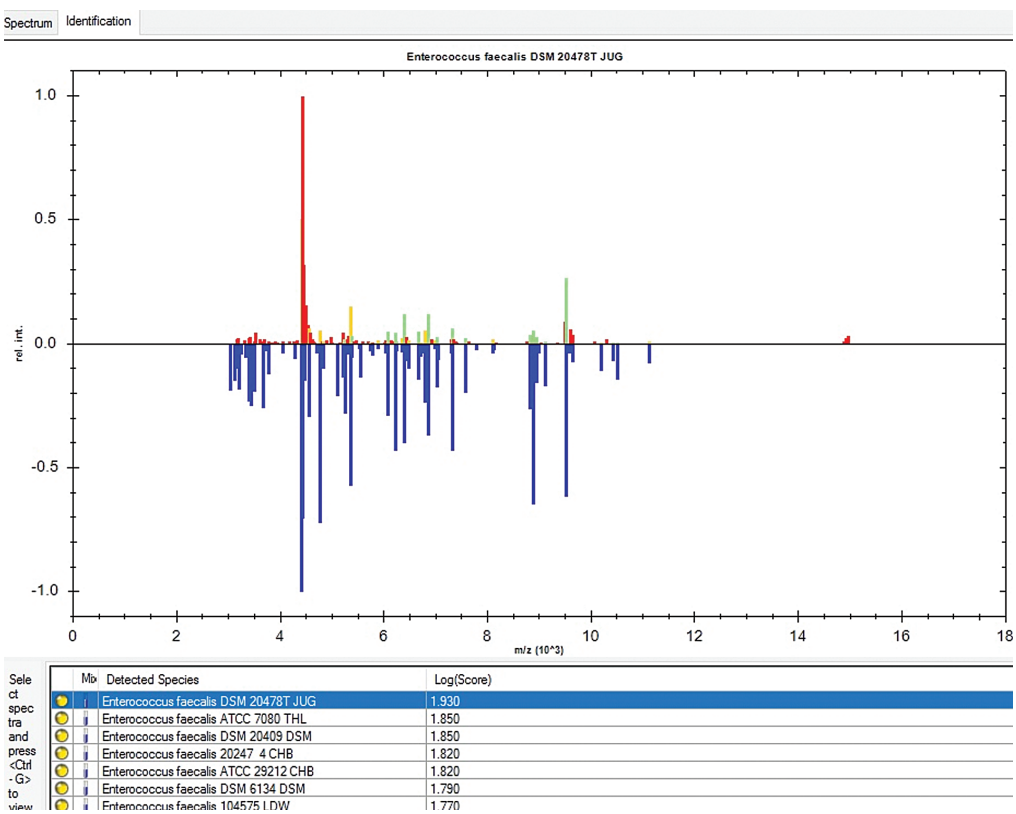


Рис. 13. Подтверждение идентификации микроорганизмов, выделенных из сточных вод, с применением MALDI-TOF MS (*Enterococcus faecalis*).
Fig. 13. Confirmation of identification microorganisms separated from wastewater using MALDI-TOF MS (*Enterococcus faecalis*).