

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Е.Л.Богдан
« » 2026 г.
Регистрационный № 031-0625

МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ
МИКОБАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С МАТРИЧНО-АКТИВИРОВАННОЙ
ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИЕЙ/ИОНИЗАЦИЕЙ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр пульмонологии и
фтизиатрии», государственное научное учреждение «Институт
биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доцент Дюсьмикеева М.И., канд. мед. наук,
доцент Богущ Л.С., канд. хим. наук Цыбрук Т.В., канд. мед. наук, доцент
Слизень В.В., Романейко А.Ю., канд. мед. наук, доцент Давидовская Е.И.

Минск, 2025

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод идентификации нетуберкулезных микобактерий (НТМ) с использованием времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией. Метод может быть применён в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику инфекций, вызванных *Mycobacterium*.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-бактериологов, иных врачей-специалистов учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с диагностированными инфекциями, вызванными *Mycobacterium* в стационарных и/или амбулаторных, и/или условиях отделений дневного пребывания.

1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Легочная инфекция, вызванная *Mycobacterium* (код по МКБ-10 A31.0);
2. Кожная инфекция, вызванная *Mycobacterium* (код по МКБ-10 A31.1);
3. Другие инфекции, вызванные *Mycobacterium* (код по МКБ-10 A31.8);
4. Инфекция, вызванная *Mycobacterium*, неуточненная (код по МКБ-10 A31.9).

2. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

3. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ДР.

3.1 Прибор (MALDI-TOF MS) - масс-спектрометр с матрично-активируемой лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролётным анализатором, предназначенный для микробиологической идентификации. Прибор должен быть оснащён импульсным лазерным источником (длина волны в ультрафиолетовом диапазоне, порядка 330–355 нм) с частотой повторения импульсов не ниже 50 Гц и обеспечивать регистрацию масс в диапазоне не менее 2 000–20 000 Да в линейном режиме с точностью измерения < 100-300 ppm.

3.2 Программное обеспечение для: 1) управления процессом измерения; 2) предварительной обработки масс-спектров (калибровка, сглаживание, нормализация интенсивности, фильтрация шума); 3) автоматизированной идентификации микроорганизмов путём сопоставления экспериментального спектра с эталонной библиотекой масс-спектров. Допускается использование программного обеспечения различных производителей при условии реализации указанных функций.

3.3 Ламинарный бокс с бактерицидной лампой III класса безопасности.

3.4 Микроцентрифуга для пробирок типа эппендорф (10000 – 15000 g).

3.5 Микроцентрифуга-вортекс.

3.6 Термостат твердотельный для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл (диапазон рабочих температур от 25 до 100 °C).

3.7 Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 8 °C.

3.8 Морозильная камера, диапазон рабочих температур от: – 16 до – 20 °C).

3.9 Комплект автоматических пипеточных дозаторов переменного объема (0,5 – 10 мкл, 5 – 50 мкл, 20 – 200 мкл, 200 мкл – 1000 мкл).

3.10 Вода качества Milli-Q.

3.11 Этанол 96%.

3.12 Этанол 70%.

3.13 Муравьиная кислота 100%.

3.14 Ацетон.

3.15 Ацетонитрил (ACN).

3.16 Матрица α -циано-4-гидроксикоричная кислота (HCCA).

3.17 Мишени (таргеты): многоцветные мишени (таргеты) для MALDI-TOF масс-спектрометрии, изготовленные из нержавеющей стали или иного материала, рекомендованного производителем прибора, с числом позиций не менее 96 (MSP Polished Target Steel, 96; или аналоги)

3.18 Калибровочный стандарт для MALDI-TOF масс-спектрометрии, предназначенный для внешней или внутренней калибровки прибора в диапазоне масс, соответствующем белковым профилям бактерий (примерно 2 000–20 000 Да), содержащий набор соединений с известными молекулярными массами (Bacterial Test Standard (BTS) или аналоги).

3.19 Пробирки пластиковые типа эппендорф 0,5 и 1,5 мл.

3.20 Наконечники одноразовые пластиковые с фильтром объемом 0,5 – 250 мкл, 200 – 1000 мкл.

3.21 Штативы для пробирок.

3.22 Халаты, латексные перчатки.

Качество используемых реактивов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для молекулярно-биологических исследований.

4. ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Материалом для исследования являются чистые культуры нетуберкулезных микобактерий. Сбор и обработку биологического материала, выделение чистых культур проводят в соответствии с «Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза», приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 22.03.2013 г. №377. Используют биомассу чистых культур НТМ, выросших на плотных питательных средах (Левенштейна–Йенсена, Мидлбука 7Н10/7Н11, агаре с сердечно-мозговой вытяжкой) или на жидких питательных средах (Мидлбука 7Н10/7Н11, бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой).

Метод предназначен для видовой идентификации культур НТМ с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF масс-спектрометрия) после предварительной инактивации возбудителей и экстракции их белков.

Идентификация НТМ методом MALDI-TOF масс-спектрометрии основана на анализе видоспецифического спектра белков низкой молекулярной массы, преимущественно рибосомальных. Исследуемый образец, содержащий растворимые белки микобактерий, наносится на мишень (MALDI-таргет) и покрывается матрицей – раствором α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (HCCA). В ходе лазерной активации, происходит десорбция и ионизация белков, которые ускоряются в однородном электрическом поле и перемещаются в зависимости от их отношения масса/заряд: лёгкие ионы достигают детектора быстрее, тяжёлые — медленнее. Детектор регистрирует приходящие ионы и преобразует их в масс-спектры — набор пиков в диапазоне 2–27.6 кДа. Полученный спектр автоматически подвергается калибровке, сглаживанию, нормализации интенсивности и фильтрации шума с помощью программного обеспечения. Идентификация выполняется путём

сопоставления спектра исследуемой культуры с эталонной библиотекой спектров. Оценка степени совпадения проводится на основе анализа положения, интенсивности и формы пиков с использованием алгоритмов, реализованных в программном обеспечении для микробиологической идентификации.

4.1 Инактивация культур и экстракция белков

4.1.1 В эппендорф с 300 мкл воды MilliQ внести одну (или две) бактериальную петлю чистой культуры НТМ, выросшей на плотной питательной среде (Левенштейна–Йенсена, Мидлбука 7Н10/7Н11, агаре с сердечно-мозговой вытяжкой), ресуспензировать культуру до гомогенной взвеси. Если проводится изучение чистых культур НТМ, выросших на жидких средах (Мидлбука 7Н10/7Н11, бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой), то 1,2 мл суспензии НТМ в жидкой среде перенести в эппендорф, центрифугировать при 6 000 g — 10 минут, удалить супернатант, добавить к осадку 300 мкл воды MilliQ и ресуспензировать осадок до получения гомогенной суспензии.

4.1.2 Проводят инактивацию путем инкубации эппендорфа с 300 мкл образца с суспензией НТМ в твердотельном термостате при 95 °С – 25 мин.

4.1.3 К инактивированной суспензии добавляют 404 мкл этанола (96%), 404 мкл ацетона, 150 мг кварцевых шариков (диаметр 0,1 – 0,5 мм). Тщательно вортексируют до получения равномерной суспензии (в течение 5 минут).

4.1.4 Центрифугируют 5 мин при 13 000 g и удаляют супернатант пипеткой. Осторожно отмывают осадок водой (700 мкл), избегая потери осадка. Воду удаляют пипеткой, досушивают осадок (2–5 мин на воздухе). Вносят 100 мкл Milli-Q воды и ресуспендируют осадок.

4.1.6 Вносят 10–50 мкл 70% муравьиной кислоты (в зависимости от объема осадка), тщательно ресуспендируют.

4.1.7 Вносят равный объем ацетонитрила и вортексируют.

4.1.8 Центрифугируют 2 мин при 13 000 g. Супернатант (содержащий растворимые белки) используют для анализа. Экстракты не хранят — используют свежие.

4.1.9 Наносят 1 мкл образца на ячейку таргета и дают высохнуть образцу.

4.1.10 Покрывают образец матрицей НССА объемом 1 мкл.

4.1.11 Высушивают при комнатной температуре.

4.1.12 Проводят калибровку прибора перед началом диагностических исследований путем исследования нанесенного на мишень калибровочного стандарта (Bacterial Test Standard (BTS) или аналоги).

4.1.13 Устанавливают мишень с нанесенным исследуемым образцом в прибор и запускают измерения со следующими характеристиками: режим линейного детектора; диапазон масс 2 000–20 000 Да.

4.2 Учёт результатов и их интерпретация

4.2.1 Учет

Прибор регистрирует масс-спектры в диапазоне 2–27.6 кДа. Программное обеспечение прибора проводит автоматическое сглаживание, фоновую коррекцию и нормализацию получаемых спектров и выводит их на экран (пример получаемых спектров на рисунке).

Программное обеспечение сопоставляет спектр образца с библиотеками эталонных штаммов нетуберкулезных микобактерий из стандартной базы прибора и выдает ответ о степени сходства НТМ, присутствующих в исследуемом образце, с эталонными спектрами из референтной библиотеки.

Ответ о сходстве идентифицируемого образца с референтной библиотекой выдается в балльной системе, которая интерпретируется следующим образом:

- Баллы ≥ 1.8 — достоверная идентификация вида.
- Баллы в диапазоне $\geq 1.6 - 1,79$ — достоверная идентификация рода/вероятная видовая.
- Баллы < 1.6 — результат недостоверный, требуется повторное исследование.

4.2.2 Интерпретация

При получении значения баллов сходства $\geq 1,6$, результат считается достаточным для проведения родовой/видовой идентификации. В этом случае идентификация осуществляется по наименованию вида, соответствующему эталонному спектру, имеющему наибольшее значение сходства с исследуемым образцом.

При значении баллов сходства $< 1,6$, уровень совпадения спектра образца со спектром из референтной библиотеки считается недостаточным для достоверной идентификации. В таких случаях следует выполнить повторную экстракцию белковых компонентов из чистой культуры микроорганизма в соответствии с протоколом и повторно провести MALDI-TOF масс-спектрометрию.

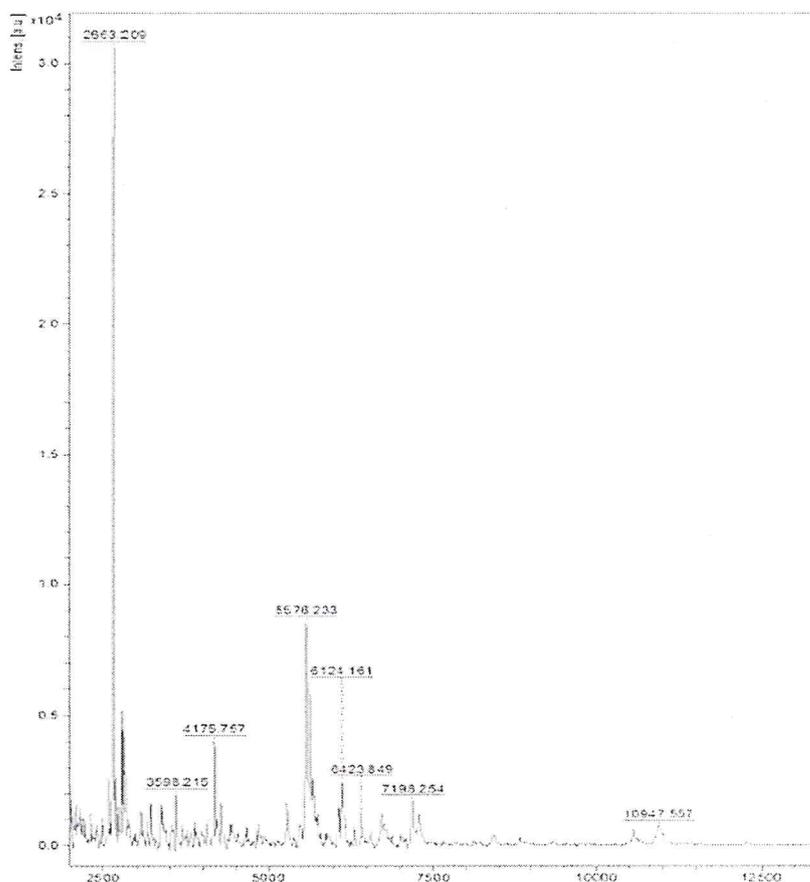
Контроль качества исследований проводят путем использования:

- Калибровочного контроля;

- Референс-штаммов НТМ;
- Матрицы НССА без образца (контроль контаминации).

5. ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

5.1. Использование культуры недостаточной чистоты



Ранг	Соответствие библиотеке прибора	Баллы	NCBI идентификатор
1 (+)	<i>Mycobacterium abscessus</i> E_09_2006 BSI	1.952	36809
2 (+)	<i>Mycobacterium abscessus</i> 04 TWF	1.706	36809
3 (-)	<i>Mycobacterium malmoense</i> 1023 BSI	1.359	1780

Рисунок – Идентификация *Mycobacterium abscessus* 9241 с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF. Масс-спектр белковой фракции культуры *Mycobacterium abscessus* 9241 (a.u. - arbitrary unit, условных единиц). Точность идентификации – 1,952 баллов

Проявление: низкие значения баллов уровня идентификации, смешанные пики, неустойчивый или хаотичный спектр. Причиной является наличие смеси видов микроорганизмов. Необходимо провести бактериологический посев с целью выделения чистой культуры.

5.2. Недостаточное количество биомассы

Проявление: слабые спектральные пики, низкая интенсивность сигналов. Ошибка обусловлена нанесением слишком малого объема биомассы, что требует повторной экстракции из образца НТМ большого объема.

5.3 Неполная кислотно-органическая экстракция

Проявление: низкие значения баллов уровня идентификации, выраженный фон, некачественная спектрограмма. Причиной является недостаточное воздействие 70% муравьиной кислоты и ацетонитрила, что приводит к неполному разрушению клеточной стенки микобактерий и выделению белков. Для устранения требуется строго соблюдать объемы реагентов и время инкубации. Необходимо повторить экстракцию белков из образца НТМ.

5.4 Неполное высушивание образца перед нанесением матрицы

Проявление: неправильная кристаллизация матрицы, "грязный" спектр. Наличие влаги препятствует формированию корректной структуры кристаллов матрицы и ухудшает ионизацию. Образец должен быть полностью высушен на воздухе до нанесения матрицы. Необходимо повторно нанести образец экстракта на матрицу.

5.5 Недостаточное разрушение клеточной стенки микобактерий

Проявление: слабый выход белков, низкие значения баллов уровня идентификации. Микобактерии обладают плотной липидной стенкой, требующей полноценной кислотной обработки. При недостаточном лизисе белковая масса выделяется плохо. Необходимо строго соблюдать протокол кислотной экстракции и при необходимости увеличивать время воздействия.

6 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Первичная обработка клинического материала (мокрота, чистые культуры МБТ) должна проводиться в лабораториях, оснащенных в соответствии с требованиями инфекционного контроля и биобезопасности в соответствии с Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 03.03.2020 № 130 (ред. от 05.05.2022) «Об утверждении специфических санитарно-эпидемиологических требований» и Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза (приказ МЗ РБ от 22.03.2013 г. №377).