



Швидкий метод ідентифікації для фармацевтичної мікробіології за допомогою MALDI Biotyper®

Olaf Degen,
менеджер з розвитку
глобального бізнесу харчової
та сільськогосподарської
мікробіології, Bruker Microbiology
& Infection Diagnostics

Вступ

Мікробіологічна якість лікарських засобів впливає як на ефективність лікування, так і на безпеку пацієнтів. Мікробне забруднення здатне спричинити миттєві або довгострокові несприятливі на-

слідки на захворюваність і смертність. Крім того, мікроби можуть змінювати хімічні та фармакологічні властивості лікарських засобів, що негативно впливає на їхню ефективність через розпад активних інгредієнтів, а також на безпеку внаслідок токсичності потенційних продуктів розпаду.

Виявлення мікробного забруднення має важливе значення для фармацевтичних виробників, які керують контрольованим середовищем. Створення програми для моніторингу навколишнього сере-

довища, за допомогою якої визначають ефективність гігієнічних практик, є ключовим фактором на виробництві. Така програма надає інформацію для відстеження забруднення через інгредієнти або біоплівки у водопроводі, щоб запобігти можливому мікробному забрудненню фармацевтичної продукції. Це також відповідає нормативним вимогам.

Протягом останнього десятиліття значного прогресу в мікробіологічних методах було досягнуто завдяки постійним інноваціям у

Таблиця 1. Дев'ять видів бактерій та дріжджів, проаналізованих в рамках оцінки ефективності

Тип	Мікроорганізм (МО)
Sporogenic Bacillus	<i>Bacillus subtilis</i>
Неспорогенні грампозитивні Bacillus	<i>Corynebacterium propinquum</i>
Грамнегативні Enterobacteriaceae	<i>Pantoea agglomerans</i>
Грамнегативні non-Enterobacteriaceae	<i>Pseudomonas koreensis</i>
Грамнегативні коки	<i>Paracoccus yeeii</i>
Грампозитивні коки (Staphylococcus)	<i>Staphylococcus capitis</i>
Грампозитивні коки (Micrococcus)	<i>Micrococcus luteus</i>
Грампозитивні коки (Streptococcus)	<i>Streptococcus sanguinis</i>
Дріжджі	<i>Candida albicans</i>

Таблиця 2. П'ять типів плісняви, проаналізованої в рамках оцінки ефективності

Пліснява
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
<i>Alternaria alternata</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Chaetomium globosum</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>

мас-спектрометрії (МС). На сьогодні стандартом в ідентифікації мікроорганізмів є МС з матричною лазерною десорбцією/іонізацією з часовим прольотом (MALDI-TOF MS), що дозволяє спеціалістам мікробіологічних лабораторій надійно, швидко та економічно ефективно ідентифікувати мікроби починаючи з колоніального матеріалу.

MALDI-TOF MS для ідентифікації мікроорганізмів

Останніми роками MALDI-TOF MS стала надійним інструментом для ідентифікації мікробів та виконання аналізу в лабораторіях. Під час MALDI-TOF MS мікроби ідентифікують за допомогою свіжого клітинного матеріалу з неселективних чи селективних агарових пластин або клітинних екстрактів. Процес є швидким, чутливим і економічним з точки зору трудовитрат і вартості.

Цю технологію мікробіологи прийняли з ентузіазмом. Вони послуговуються MALDI-TOF MS для

ідентифікації та підтвердження мікробів, проведення епідеміологічних досліджень, ідентифікації високопатогенних мікроорганізмів, патогенних мікроорганізмів, що передаються через воду та харчові продукти, а також мікробіоти шкіри.

Рішення Bruker MALDI Biotyper®

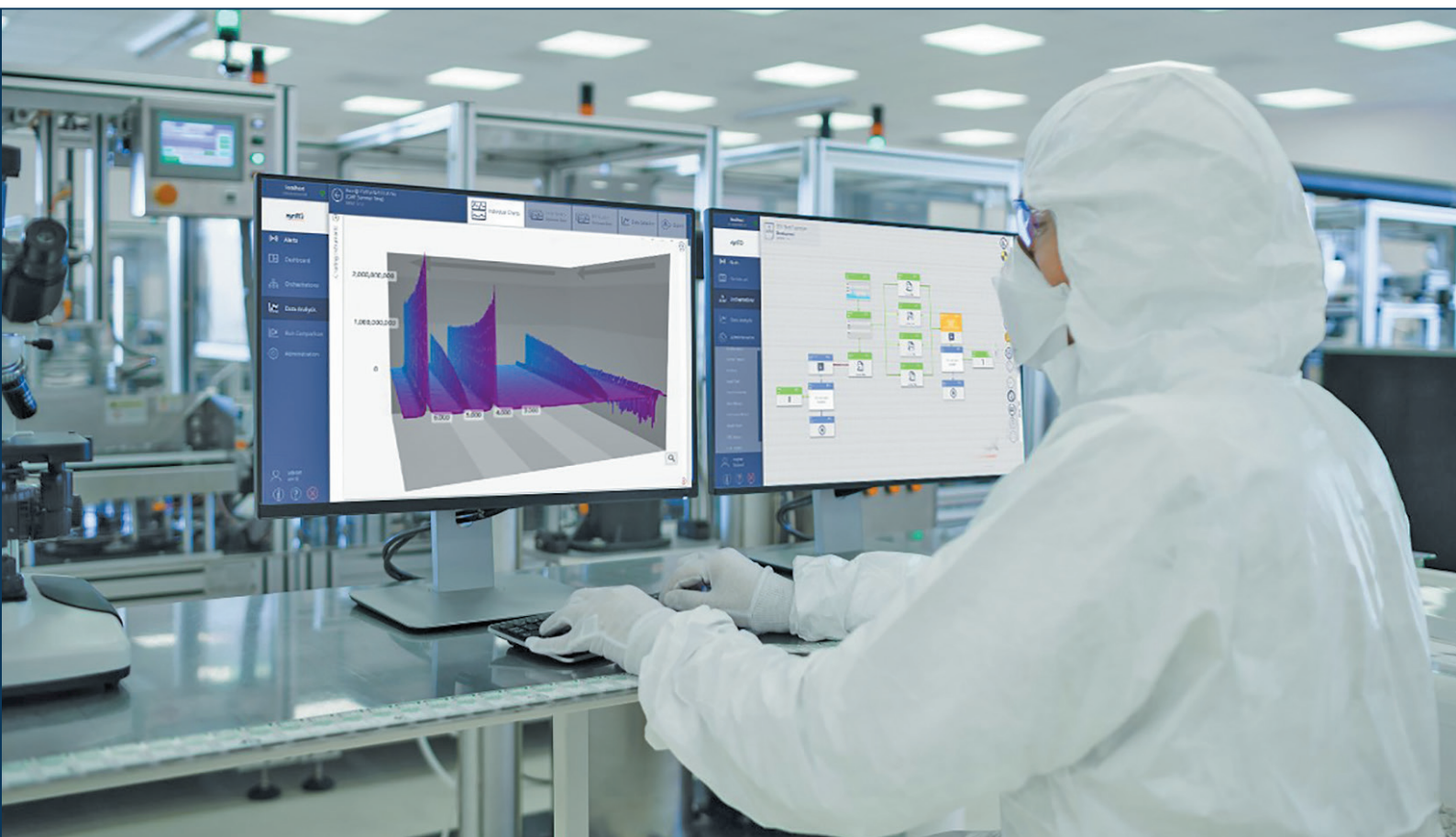
Компанія Bruker успішно представила метод ідентифікації на основі молекулярної МС, який забезпечує більш швидкий і ефективніший аналіз, ніж звичайні аналізи або метод секвенування.

MALDI Biotyper® (MBT) – це система для ідентифікації мікроорганізмів, яка дозволяє проводити неупереджену оцінку мікроорганізмів аж до видового рівня протягом декількох хвилин починаючи з культури. Це проста, швидка, надійна, високопродуктивна, економічна і ефективна технологія ідентифікації, що ідеально підходить для застосування в мікробіологічних лабораторіях.

Визначаючи унікальний протеомний відбиток організму і зіставляючи цей характерний патерн з великою довідковою бібліотекою, MBT може надійно ідентифікувати невідомий мікроорганізм. Бібліотека MALDI Biotyper® наразі охоплює близько 4700 видів (версія 2022 р.), включаючи поширені в навколишньому середовищі види, а також рідкісні мікроорганізми. Постійне розширення довідкової бібліотеки гарантує, що широкий спектр мікроорганізмів можна легко ідентифікувати. Крім того, концепція відкритого програмного забезпечення Bruker дозволяє створювати власну бібліотеку, специфічну для конкретного об'єкта, яка може бути обрана разом з еталонною бібліотекою Bruker для зіставлення з невідомим спектром.

Оцінка ефективності

Великий фармацевтичний виробник провів мікробіологічну ідентифі-



кацію зразків, отриманих в результаті моніторингу навколишнього середовища, води і виробничих операторів, а також виконав у лабораторії

скринінгові аналізи інгредієнтів і готової продукції, щоб оцінити точність, специфічність, прецизійність і відтворюваність MBT Bruker для

зразків бактерій, дріжджів і плісняви. Додаткове тестування проводили з метою оцінки надійності MBT на зразках плісняви.

Фахівці лабораторії розробили протокол кваліфікації роботи з урахуванням досвіду мікробіологічних лабораторій на інших міжнародних майданчиках компанії. В главі 1113 Фармакопеї США (USP) наведено різні варіанти кваліфікації ефективності:

1. Використання існуючої системи для паралельного тестування ізолятів мікроорганізмів, отриманих в результаті рутинного тестування (кількість протестованих ізолятів може досягати 50, а будь-які розбіжності в ідентифікації можна вирішити за допомогою референтного зразка).
2. Тестування 12 – 15 відомих репрезентативних вихідних культур часто різних ізольованих видів (загалом 50 тестів).
3. Підтвердження того, що 20 – 50 ідентифікацій організмів, у тому числі 15 – 20 різних видів, збігаються з результатами тесту, проведеного у референтній лабораторії.

Протокол для бактерій і дріжджів

Було проаналізовано дев'ять різних типів мікроорганізмів переважно екологічного походження (бактерії та дріжджі) (табл. 1). Кожен мікроорганізм оцінювали за такими параметрами:

- точність і специфічність;
- подвійна ідентифікація з MBT, порівняння результатів з даними референтного методу;
- прецизійність. Один ізолят з навколишнього середовища ідентифікували десять разів у двох екземплярах, щоб визначити кількість разів правильної ідентифікації;
- відтворюваність. Три аналітики виконували аналізи дев'яти мікроорганізмів протягом трьох різних днів, щоб визначити їхню відтворюваність.

Таблиця 3. Критерії прийнятності згідно з Фармакопеєю США (глава 1113, Технічний звіт PDA 33)

Критерії прийнятності	
Точність Прецизійність Специфічність	>90% правильних ID
Відтворюваність	>90% правильних ID між 3 операторами

Таблиця 4. Результати точності та специфічності для зразків бактерій та дріжджів. Вимірювання 9 зразків показало 100% точність і специфічність. Оцінка 2,0 або вище вказує на правильну ідентифікацію на рівні виду, оцінки від 1,7 до <2,0 вказують на ідентифікацію на рівні роду

Тип МО	Прищеплений МО	Визначений МО	Оцінка	Правильність ID Т/Н
Спорогенні <i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	2,264	T
Неспорогенні грампозитивні <i>Bacillus</i>	<i>Corynebacterium propinquum</i>	<i>Corynebacterium propinquum</i>	2,516	T
Грамотрикативні <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	2,435	T
Грамотрикативні <i>non-Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,277	T
Грамотрикативні коки	<i>Paracoccus yeeii</i>	<i>Paracoccus yeeii</i>	2,412	T
Грампозитивні коки (<i>Staphylococcus</i>)	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	2,450	T
Грампозитивні коки (<i>Micrococcus</i>)	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	2,450	T
Грампозитивні коки (<i>Streptococcus</i>)	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2,210	T
Дріжджі	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	2,293	T

Таблиця 5. Результати відтворюваності для зразків бактерій та дріжджів

Збудник	Прищеплений МО	Визначений МО	Аналітик 1 Оцінка	Правильність ID Т/Н	Аналітик 2 Оцінка	Правильність ID Т/Н	Аналітик 3 Оцінка	Правильність ID Т/Н
Спорогенні <i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	2,321	Т	2,185	Т	2,293	Т
Неспорогенні грампозитивні <i>Bacillus</i>	<i>Corynebacterium propinquum</i>	<i>Corynebacterium propinquum</i>	2,390	Т	2,487	Т	2,527	Т
Грамнегативні <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	2,436	Т	2,468	Т	2,446	Т
Грамнегативні <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2,279	Т	2,306	Т	2,209	Т
Грамнегативні коки	<i>Paracoccus yeeii</i>	<i>Paracoccus yeeii</i>	2,471	Т	2,406	Т	2,402	Т
Грампозитивні коки (<i>Staphylococcus</i>)	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	2,321	Т	2,406	Т	2,409	Т
Грампозитивні коки (<i>Micrococcus</i>)	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	2,504	Т	2,440	Т	2,410	Т
Грампозитивні коки (<i>Streptococcus</i>)	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2,212	Т	2,290	Т	2,296	Т
Дріжджі	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	2,169	Т	2,256	Т	2,209	Т

Таблиця 6. Точність і специфічність результатів для зразків цвілі

Прищеплений МО Правильність ID Т/Н	Визначений МО Правильність ID Т/Н	Оцінка	Правильність ID Т/Н
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Aspergillus niger</i> (renamed to <i>A. brasiliensis</i>)	1,974	Y
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	2,436	Y
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,620	Y
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	2,594	Y
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	2,447	Y

Протокол для плісняви

Було проаналізовано п'ять різних типів цвілевих грибів – чотири з навколишнього середовища та один штам з Американської колекції типових культур (ATCC) (табл. 2). Кожен мікроорганізм оцінювали за такими параметрами:

- **точність і специфічність/прецизійність/відтворюваність.** Аналізи п'яти плісня-

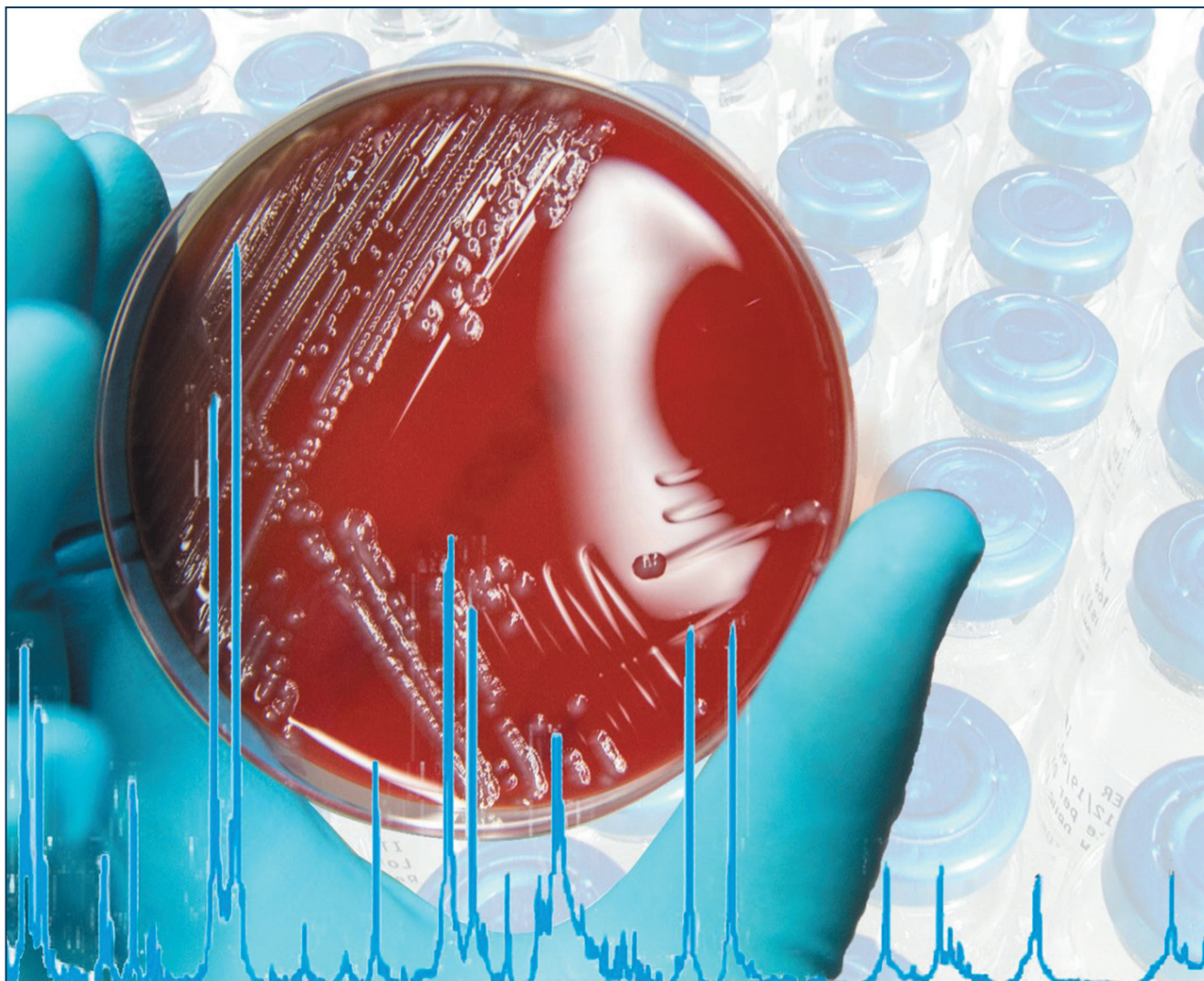
вих форм були проведені, як описано вище для бактерій і дріжджів;

- **надійність.** Ідентифікацію МВТ проводили та порівнювали з результатами референтних методів, якими послуговувались для ідентифікації пліснявих грибів. Для цього використовували дві різні партії рідкого середовища TSB, а та-

кож одну партію НССА-матриці, з якої набирали дві пробірки; одна пробірка НССА-матриці була приготована в день аналізу, інша – за 8 днів до аналізу (а отже, була прострочена);

- **прийнятність.**

Критерії точності, специфічності, прецизійності та відтворю-



ваності наведено в табл. 3 з урахуванням результатів ідентифікації на Bruker MALDI Biotyper®:

- **Log (оцінка)** між $\geq 2,000$ та $3,000$: мікроорганізм добре ідентифіковано до видового рівня.
- **Log (оцінка)*** між $\geq 1,700$ та $\leq 1,999$: мікроорганізм добре ідентифіковано до рівня роду.
- **Log (оцінка)** між $\geq 0,000$ та $\leq 1,699$: мікроорганізм не ідентифіковано або не знайдено жодного піка.

Примітка

*У кваліфікації ефективності жовті бали приймали, якщо отриманий вид був таким самим, як і в референтному методі.

Результати

Бактерії та дріжджі

Отримано високі результати ідентифікації МВТ. Точність і специфічність забезпечили 100% правильну ідентифікацію на рівні виду для всіх бактерій і дріжджів (табл. 4). Значення Log (оцінка) наведено в колонці «Оцінка».

Повторення 10 разів аналізу одного ізоляту з навколишнього середовища (*Staphylococcus caritis*) у двох екземплярах дало точність 100% (результати не наведено). Аналогічні результати отримано з метою відтворюваності для всіх бактерій і дріжджів (табл. 5); 100% правильну ідентифікацію спостерігали щодо трьох операторів.

Пліснява

Для оцінки аналізу цвілевих грибів також отримано високі показники ідентифікації МВТ. Точність і специфічність дозволили ідентифікувати всі плісняві гриби до видового рівня, за винятком *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, який було ідентифіковано до рівня роду [діапазон значень 1,7 – 2,0] (табл. 6).

Повторення 10 разів аналізу одного ізоляту з навколишнього середовища (*Alternaria alternata*) в двох екземплярах дало точність 100% (результати не наведено).

Оцінка відтворюваності (табл. 7) та надійності (табл. 8) дала високі результати, за винятком *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (всі результати для *A. brasiliensis* мали значен-

Таблиця 7. Результати відтворюваності для зразків плісняви

Прищеплений МО	Визначений МО	Аналітик 1 Оцінка	Правиль- ність ID Т/Н	Аналітик 2 Оцінка	Правиль- ність ID Т/Н	Аналітик 3 Оцінка	Правиль- ність ID Т/Н
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Aspergillus niger</i> (renamed to <i>A. brasiliensis</i>)	2,078	T	2,028	T	1,886	T
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	2,343	T	2,361	T	2,441	T
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,597	T	2,639	T	2,73	T
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	2,607	T	2,617	T	2,595	T
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	2,519	T	2,333	T	2,552	T
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Aspergillus niger</i> (renamed to <i>A. brasiliensis</i>)	2,078	T	2,028	T	1,886	T
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	2,343	T	2,361	T	2,441	T

Таблиця 8. Результати надійності для зразків плісняви

Прищеплений МО	Визначений МО	Партія TSB № 1 – свіжа матриця НССА Оцінка	Партія TSB № 1 – 8-денна матриця НССА Оцінка	Партія TSB № 2 – свіжа матриця НССА Оцінка	Правильність ID Т/Н
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Aspergillus niger</i> (renamed to <i>A. brasiliensis</i>)	1,938	1,974	1,970	T
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	2,428	2,412	2,482	T
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,690	2,680	2,467	T
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	2,538	2,439	2,542	T
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	2,562	2,566	2,566	T

ня $\log(\text{score}) > 1,7$). Навіть у разі використання простроченої пробірки з відновленою НССА-матрицею результати залишалися високими.

Висновки

Впровадження MALDI Biotyper® як внутрішнього експрес-мікробіологічного методу сприяє значному зниженню вартості/ідентифікації лише до кількох євро за зразок (рисунок), що в даному випадку

заощаджує близько EUR 265 тис. щорічно, виходячи з припущення про 5000 зразків на рік.

Значна економія коштів

Висока надійність, економія часу порівняно з показниками у разі застосування власних методів і простота використання MBT Bruker забезпечують значну економію коштів на проведення одієї ідентифікації.

Надійність

Завдяки використанню Bruker MBT отримано надійні та правильні результати ідентифікації для всіх протестованих бактерій, дріжджів і пліснявих грибів.

Економія часу

Фармацевтичні мікробіологічні лабораторії можуть отримати вигоду від економії часу, виконуючи ідентифікацію протягом декіль-





Витрати/ІД в аутсорсингу до (2016) та після переговорів (2017)

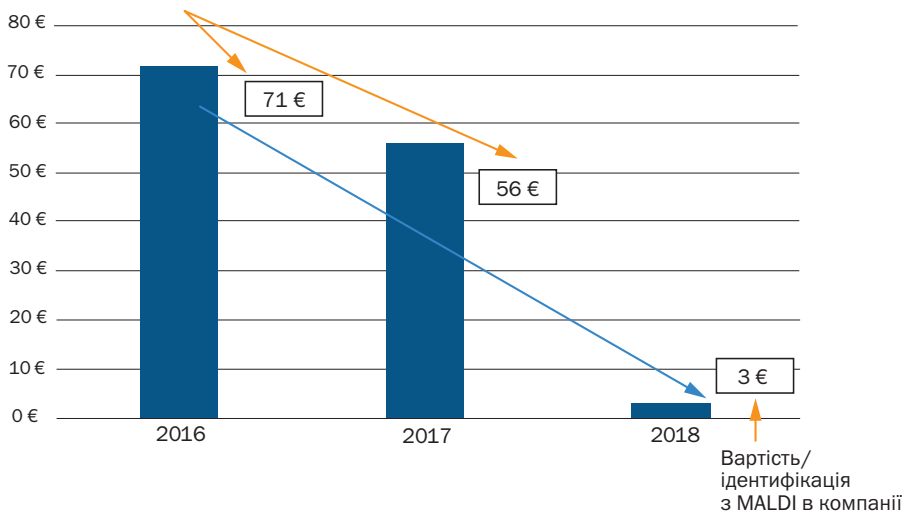


Рисунок. Економічна ефективність ідентифікації за допомогою Bruker MALDI Biotyper®

кох хвилин після дуже короткого практичного часу, використовуючи одну систему і один робочий процес. Це дозволяє аналізувати бактерії, дріжджі і цвілеві гриби в одному тестовому циклі з можливістю обробки до 96 зразків за один цикл.

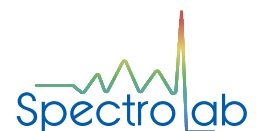
Простота використання

Технічний персонал легко навчається робочого процесу MBT, а результати ідентифікації чітко відображаються в зручних для інтерпретації звітах у форматі PDF. MBT не потребує застосування інших традиційних методів іден-

тифікації, таких як забарвлення за Грамом або біохімічне тестування.

Підсумок

MALDI Biotyper® забезпечує точні і швидкі результати для ідентифікації мікроорганізмів, дозволяючи працівникам фармацевтичних лабораторій швидко визначати штамми з навколишнього середовища, бактерії з води, а також звичайні або патогенні види бактерій та грибів. ■



ТОВ «СПЕКТРОЛАБ»

Україна, Київ
Тел.: +38 044 221-06-53,
+38 063 187-21-47

info@splab.com.ua
www.splab.com.ua





MALDI Biotyper®

Чи готові ви до нового Додатку 1 до GMP ЄС?

Мікробіологія у фармацевтичній лабораторії

Інновації з чесністю

Bruker пропонує найсучасніші рішення для фармацевтичної мікробіології

Модернізація та автоматизація в мікробіології є значними перевагами для запобігання забрудненню, для моніторингу навколишнього середовища і оператора, а також для поліпшення відстеження мікробних забруднень. Оцінка бактеріальних і грибкових колоній лабораторними експертами може бути скорочена завдяки використанню MALDI Biotyper® від Bruker для швидкої ідентифікації мікроорганізмів, заснованої на технології MALDI-TOF.

Особливості та переваги

- Широке покриття мікробів, що переносяться в повітрі та воді, патогенних бактерій та грибків
- Забезпечує швидкий внутрішній аналіз на основі колоній з численних типів агару в той самий день
- Пластини для зразків (MBT Biotarget 96) забезпечують високу гнучкість щодо кількості зразків, будь то низька або висока пропусканна здатність.
- Жодна пляма не є втраченою.
- Новий простий протокол для нитчастих грибів, безпосередньо з агару, без рідкої культури
- Програмне забезпечення, що відповідає вимогам FDA 21 CFR, частина 11, забезпечує повне відстеження
- Нове та швидке програмне рішення, що надає результати аналізу за лічені секунди
- Інструменти "Зроблено в Німеччині"

