

Афанасьев М.В., Остяк А.С., Балахонов С.В.

АПРОБАЦИЯ МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С МАТРИЧНО-АКТИВИРОВАННОЙ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИЕЙ/ИОНИЗАЦИЕЙ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 664047, Иркутск

С использованием современного метода идентификации микроорганизмов MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа проведено исследование выборки штаммов *Y. pestis* основного и алтайского подвидов. Выполнена оценка биологической безопасности метода пробоподготовки, для пополнения идентификационной базы BioTyper получены спектры типовых штаммов *Y. pestis*. Расширенную идентификационную базу использовали для оценки возможности применения технологии MALDI-TOF для идентификации и таксономической дифференциации *Y. pestis* от других представителей рода *Yersinia*. При исследовании наблюдалось полное соответствие результатов масс-спектрометрической идентификации и классического культурального метода. На основании масс-спектрометрической характеристики исследуемой выборки удалось провести дифференциацию штаммов *Y. pestis* подвида *pestis* от штаммов подвида *altaica*. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения масс-спектрометрического анализа для достоверной меж- и внутривидовой дифференциации возбудителя чумы. Простота и скорость пробоподготовки и выполнения анализа, низкая стоимость расходных материалов позволяют рассматривать метод MALDI-TOF масс-спектрометрической идентификации как весьма перспективный для лабораторной диагностики возбудителя чумы.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*; MALDI-TOF-MS-идентификация; биомаркеры.

M.V. Afanasyev, A.S. Ostiyak, S.V. Balakhonov

THE APPROBATION OF TECHNIQUE OF MASS SPECTROMETRY WITH MATRIX-ACTIVATED LASER DESORPTION/IONIZATION FOR IDENTIFICATION OF PLAGUE AGENT

The Irkutsk antiplague research institute of Rosпотребнадзор, 664047 Irkutsk, Russia

The study of sampling of strains of *Y. pestis* of main and altaic subspecies was implemented. The modern technique of identification of microorganisms was applied using MALDI-TOF mass spectrometry analysis. The evaluation of biological safety of method of sampling preparation was implemented. To supplement the identification base "BioTyper" the spectrum of typical strains of *Y. pestis* were obtained. The enhanced identification base was used to evaluate possibilities of application of MALDI-TOF technology for identification and taxonomic differentiation of *Y. pestis* from other representatives of genus of *Yersinia*. In the process of study a complete concordance of results of mass spectrometry identification and classic cultural method was observed. On the basis of mass spectrometry characteristic of analyzed sampling the differentiation between strains of *Y. pestis* of subspecies *pestis* and strains of subspecies *altaica* was implemented.

The study results testify the effectiveness of application of mass spectrometry analysis for reliable interspecies and intraspecific differentiation of plague agent. The simplicity and velocity of sampling preparation and implementation of analysis and low cost of active storage allow considering the MALDI-TOF technology of mass spectrometry identification as highly perspective method for laboratory diagnostic of plague agent.

Key words: *Yersinia pestis*; MALDI-TOF identification; biomarker.

Введение. Чума — природно-очаговая инфекция с преимущественно трансмиссивным механизмом передачи, вызываемая *Yersinia pestis*. Наличие в мире, в частности на территории Российской Федерации активных природных очагов чумы, угроза проникновения и распространения инфекции в человеческой популяции, потенциальная возможность использования возбудителя чумы в качестве агента биологического терроризма обуславливает необходимость совершенствования мер диагностики, профилактики, терапии и мониторинга этой инфекции [1]. Быстрая и эффективная индикация и идентификация возбудителя чумы является одной из важнейших задач клинической микробиологии, определяющей своевременную постановку диагноза, а также реализацию полного объема противоэпидемических и профилактических мероприятий. На сегодняшний день в лабораторной диагностике чумы используют как классические микробиологические методы, основанные на изучении фенотипических свойств возбудителя, так и новые, в основе которых лежит молекулярно-генетический анализ [2—6]. Несмотря

на ряд преимуществ методов генодиагностики, изоляция чистой культуры возбудителя и определение его свойств остаются "золотым стандартом" клинической микробиологии. С этим связан большой интерес к новым методам, позволяющим проводить углубленное изучение полученного изолята на молекулярном уровне.

Одним из таких методов является времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (англ. Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry — MALDI TOF-MS). Идентификация исследуемого объекта осуществляется на основании сравнительного анализа его белковых профилей, являющихся видоспецифичными, а в некоторых случаях — и штаммоспецифичными [7]. Суть метода заключается в матрично-опосредованной "мягкой" ионизации клеточных белков исследуемого патогена с последующим определением отношения массы к заряду ионов; на основе этих данных формируются характерные спектры [8]. Собранные в процессе анализа спектры исследуемых микроорганизмов сравнивают с референсными спектрами, присутствующими в базе данных. По степени совпадения определяют результат относительно таксономической принадлежности исследуемого объекта.

Для MALDI-TOF-MS необходимо наличие обширной базы данных референсных спектров исследуемых патогенов. Ком-

Для корреспонденции:

Афанасьев Максим Владимирович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр.
Адрес: 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78
E-mail: afanasev_max@mail.ru

мерчески доступные базы данных масс-спектрометрической платформы BioTyper ("Bruker Daltonics", Германия), поставляемой в Российскую Федерацию, не содержат спектров возбудителей особо опасных инфекций, в частности чумы. В связи с этим существует необходимость создания собственной референсной базы данных для успешной идентификации указанной группы микроорганизмов.

Учитывая все вышесказанное, цель исследования — создание референсных спектров *Y. pestis*, а также апробация метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации для идентификации возбудителя чумы, представляется достаточно актуальной и перспективной.

Материалы и методы. В работе использовали 27 штаммов *Y. pestis* подвидов *altaica* и *pestis*, выделенных на территории Горно-Алтайского и Тувинского природных очагов чумы и Монголии. Все штаммы обладали типичными, характерными для соответствующего подвида *Y. pestis* фенотипическими и генетическими свойствами.

Для масс-спектрометрического анализа штаммы выращивали на питательном агаре для культивирования микроорганизмов общего назначения, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) в течение 24 ч при 28°C. Дополнительно 7 штаммов из указанной группы культивировали на агаре Хоттингера, pH 7,2 (Иркутский НИПЧИ) в тех же условиях. Экстракцию белков проводили следующим образом: исследуемый материал обрабатывали 70% этанолом, 70% раствором муравьиной кислоты с последующим добавлением ацетонитрила [9].

Проверке на специфическую стерильность подвергались полученные по описанному выше протоколу белковые экстракты 3 штаммов *Y. pestis*. Для каждого штамма готовили 3 серии белковых препаратов. Полученные экстракты, а также смывы с поверхности MSP-чипа с нанесенным на него экстрактом и матрицей исследовали на наличие живых *Y. pestis* в соответствии с Инструкцией по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерного микробов [10].

Для масс-спектрометрического анализа по 1 мкл белкового экстракта вносили в лунку 96-луночного MSP-чипа. После подсыхания при комнатной температуре в течение 10—15 мин на образец наносили матрицу (насыщенный водный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, содержащий 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). В качестве контроля и калибровочного стандарта использовали белковый экстракт штамма *E. coli* DH5a (ref. № 255343; "Bruker Daltonics", Германия).

Сбор спектров проводили на масс-спектрометре Microflex™ LT MALDI-TOF ("Bruker Daltonics", Германия). Для получения одиночного масс-спектра использовали 40 импульсов лазера (частота 60 Гц), анализируемый диапазон масса/заряд составлял 2000—20 000 Да. С каждой лунки чипа снимался исходный спектр, представляющий собой сумму 6 одиночных спектров (240 импульсов лазера).

Семь штаммов *Y. pestis*, выращенных на питательном агаре, использовали для создания референсных спектров. Для этих штаммов исследование проводили в 12 повторах. MALDI-TOF масс-спектрометрическую идентификацию исследуемой выборки штаммов осуществляли в автоматическом режиме.

Анализ спектров, генерацию референсных библиотек и идентификацию выполняли с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 ("Bruker Daltonics", Германия). Заключение о таксономической принадлежности микроорганизма делали на основании значения индекса совпадения (параметр score value — SV). Значение $SV \geq 2,3$ соответствовало достоверной идентификации до вида, $SV < 2,299$, но $> 2,000$ — достоверной идентификации до рода, вероятной идентификации до вида, значение SV в диапазоне 1,7 — 1,999 рассматривали как вероятную идентификацию до рода и $< 1,7$ — как недостоверный результат.

Кластерный анализ и построение дендрограмм осуществляли с использованием инструментов MALDI Biotyper 3.0 ("Bruker Daltonics", Германия) и BioNumerics 6.6 ("Applied Maths", Бельгия).

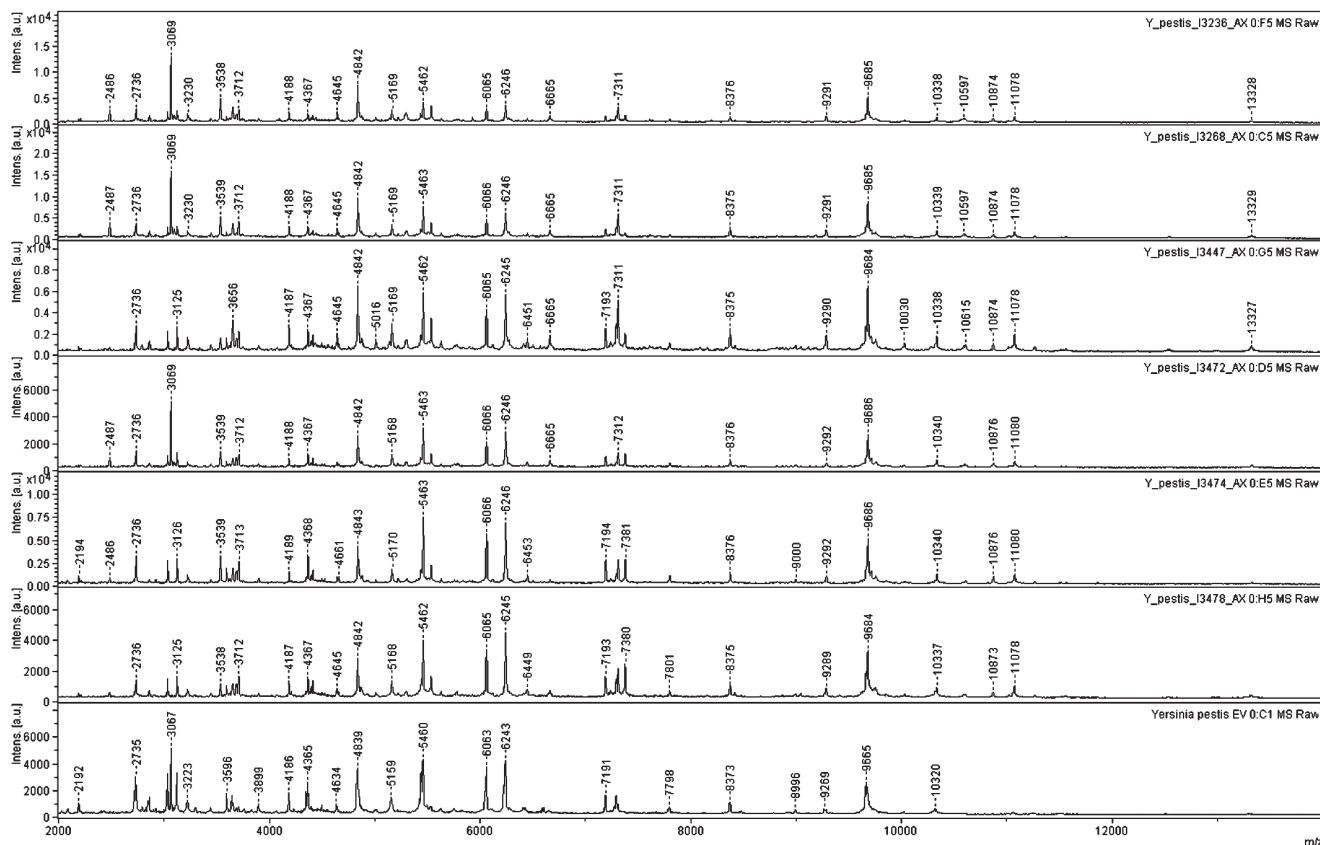


Рис. 1. Масс-спектры 7 штаммов *Y. pestis* (И-3236, И-3268, И-3447, И-3472, И-3474, И-3478, EV), использованных для создания референсных спектров.

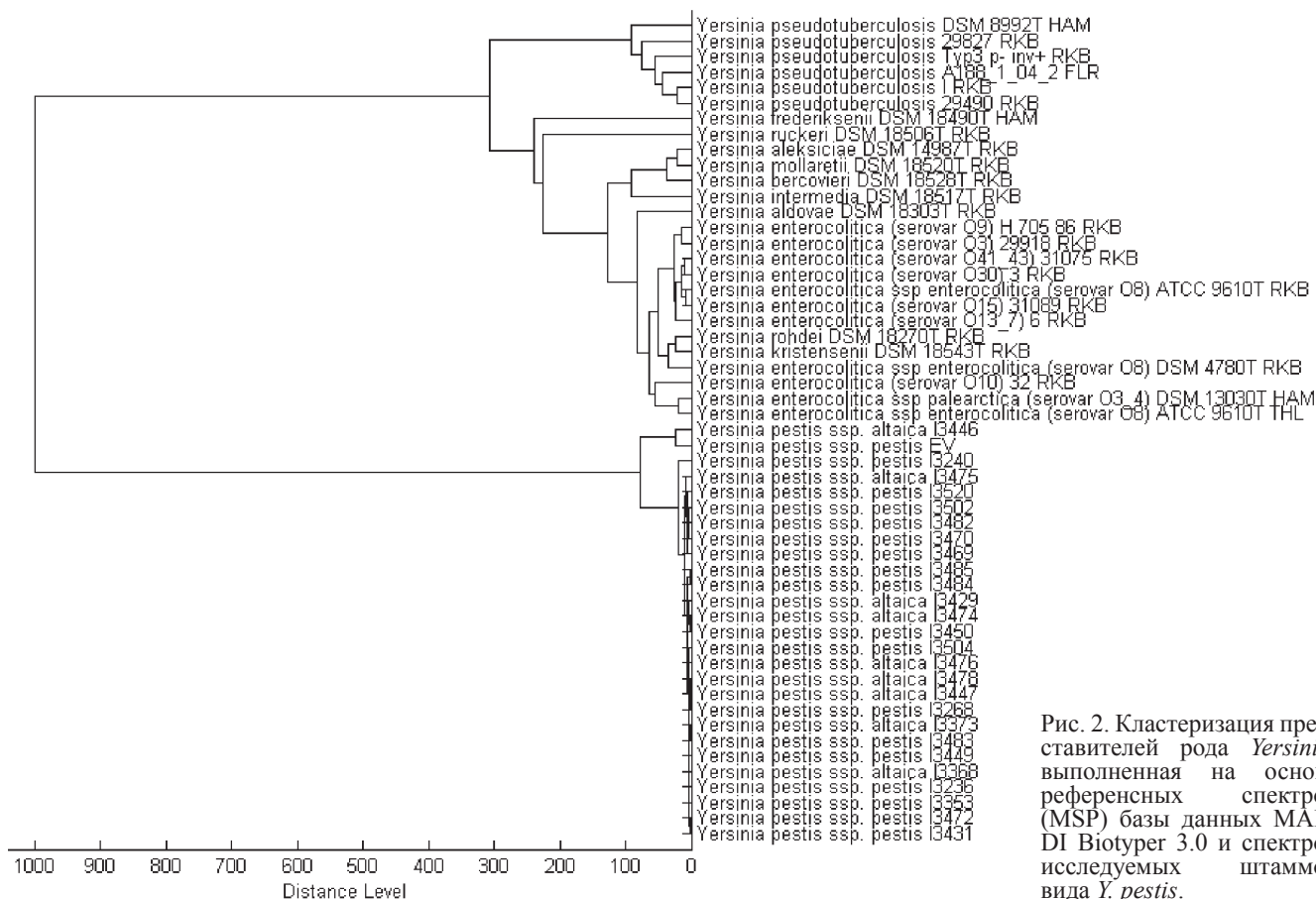


Рис. 2. Кластеризация представителей рода *Yersinia*, выполненная на основе референсных спектров (MSP) базы данных MALDI Biotyper 3.0 и спектров исследуемых штаммов вида *Y. pestis*.

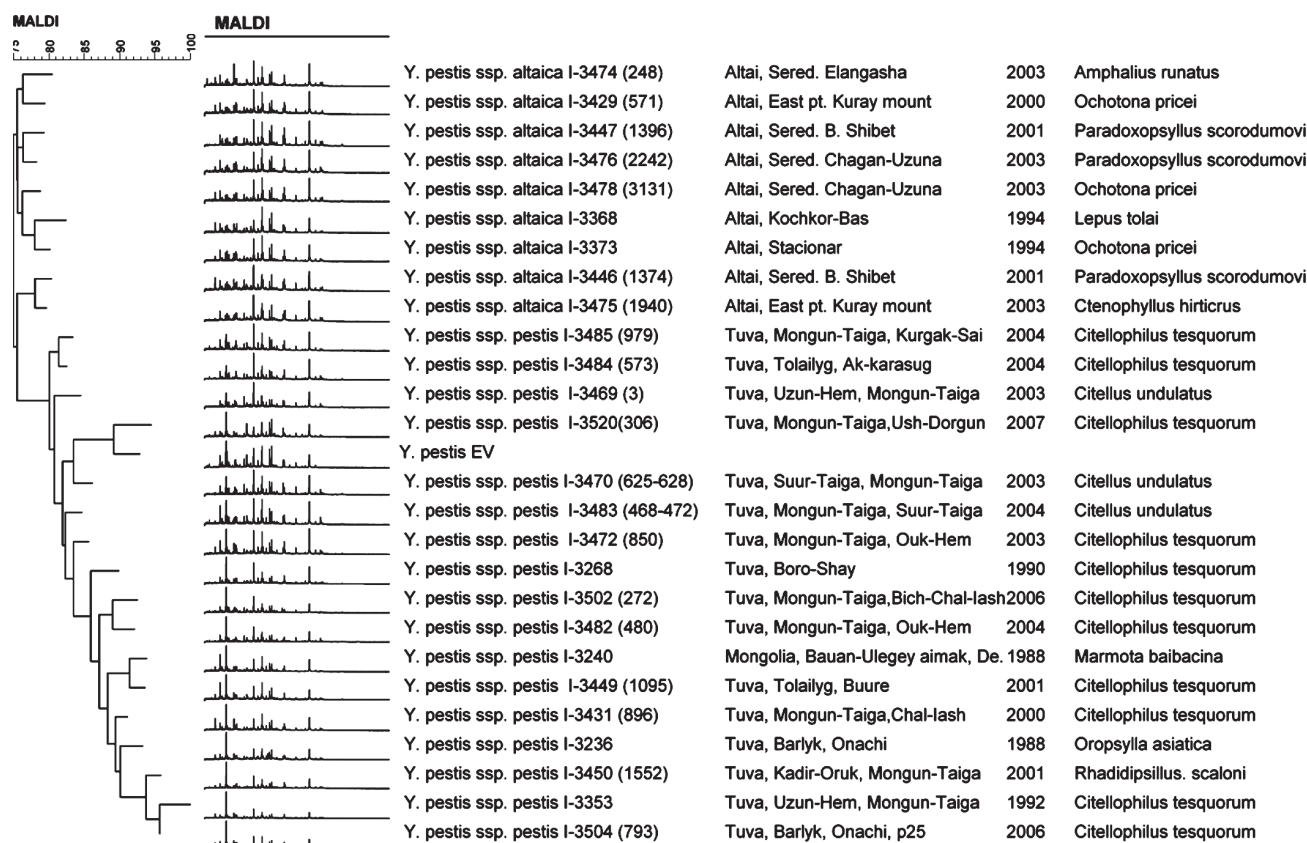


Рис. 3. Дендрограмма исследуемых штаммов *Y. pestis* основного и алтайского подвидов. Указаны инвентарный номер штамма, место, год и источник выделения.

Для определения достоверности различий значений SV спектров исследуемых штаммов при использовании разных питательных сред применяли непараметрический критерий Вилкоксона.

Результаты и обсуждение. Конструктивные особенности масс-спектрометра Microflex Bruker Daltonics не предусматривают дезинфекции внутренней рабочей зоны прибора. В связи с этим возникла необходимость проверки инактивирующей способности метода пробоподготовки вирулентных штаммов *Y. pestis* (I группа патогенности).

Метод спиртовой обработки с последующей экстракцией муравьиной кислотой и ацетонитрилом обеспечивает обеззараживание патогенных иерсиний, а также удовлетворительное качество получаемых спектров и сохранность белковых экстрактов [11, 12]. Исследования на специфическую стерильность подтвердили отсутствие жизнеспособных форм *Y. pestis* в белковых экстрактах, а также смывах с поверхности MS-чипа, что позволяет осуществлять дальнейшие манипуляции в соответствии требованиями, предъявляемыми к обеззараженному материалу.

Референсные спектры *Y. pestis*, импортированные в базу данных программы MALDI Biotyper 3.0, получены из белковых экстрактов 7 штаммов *Y. pestis* подвидов *altaica* и *pestis*, выращенных на питательном агаре для культивирования микроорганизмов, при этом 6 штаммов являлись вирулентными, а седьмой, *Y. pestis* EV, — вакцинным. Масс-спектрометрические профили штаммов представлены на рис. 1. Параметры получения масс-спектров: алгоритм идентификации пика — Centroid, отношение сигнал/шум для пиков спектров — не менее 2, минимальная интенсивность пика — не менее 100 относительных единиц, количество качественных пиков — до 300, ширина пика — 4 m/z (отношение массы к заряду). Дополненная база данных использована для дальнейшей работы по идентификации.

На следующем этапе исследовали 20 штаммов *Y. pestis* подвидов *altaica* и *pestis*, выращенных на питательном агаре для культивирования микроорганизмов. Результаты масс-спектрометрической идентификации полностью совпадали с данными классического бактериологического анализа. Среднее значение SV для исследованных микроорганизмов составило 2,552 (минимальное значение — 2,319, максимальное — 2,668), что свидетельствует о достоверной видовой идентификации. Ранее в некоторых работах были получены противоречивые результаты дифференциации *Y. pestis* от других видов близкородственных иерсиний, в первую очередь от *Y. pseudotuberculosis* [13]. Однако при сравнительном анализе спектров исследуемых штаммов *Y. pestis* и спектров других представителей рода *Yersinia*, имеющихся в базе программы "BioTyper", наблюдалась корректная таксономическая дифференциация разных видов этого рода (рис. 2).

Детальный анализ спектров выявил отсутствие пика со значением m/z 3065±2 у штаммов *Y. pestis* ssp. *altaica*. В предшествующих работах данный пик, соответствующий пептиду, состоящему из 30 аминокислотных остатков и образующемуся в процессе посттрансляционной модификации молекулы активатора плазминогена (Pla) в результате отщепления N-концевого фрагмента, рассматривали как видоспецифичный для *Y. pestis* биомаркер [14]. Очевидно, отсутствие этого маркера у штаммов алтайского подвида требует поиска дополнительных масс-спектрометрических биомаркеров, специфичных для возбудителя чумы неосновных подвидов.

При сопоставлении результатов исследования штаммов, выращенных на разных питательных средах, выявлена значимая зависимость SV от вида среды: среднее значение SV при исследовании одних и тех же штаммов с питательного агара составляло 2,665, а с агара Хоттингера — 2,44 ($p = 0,017961$). Это свидетельствует о необходимости одинаковых условий при подготовке штаммов как для создания референсных спектров, так и для масс-спектрометрических исследований. Однако необходимо отметить, что при использовании любой

из двух использованных сред удалось идентифицировать микроорганизм до вида.

Предпринята попытка оценки возможности использования масс-спектрометрического анализа для внутривидовой дифференциации исследуемых штаммов. Данный методологический подход ранее применяли для идентификации штаммов чумы, относящихся к различным биоварам [15], а также для установления вероятного источника происхождения штамма *Y. pestis*, выделенного на не свойственной для него территории [16]. Дендрограмма, построенная на основании сравнительного анализа масс-спектров штаммов 2 подвидов, основного и алтайского, демонстрирует эффективное разделение штаммов *Y. pestis* разных подвидов (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения масс-спектрометрического анализа для достоверной и эффективной межвидовой дифференциации возбудителя чумы от других представителей рода *Yersinia*. Перспективным представляется также использование метода для внутривидовой идентификации и эпидемиологического типирования *Y. pestis*, в основе которого лежат усовершенствованные подходы математического и статистического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 4—9, 11—15 см. в REFERENCES)

1. Онищенко Г.Г., ред. *Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири*. М.: Медицина; 2004.
2. Балахонов С.В. *Геномные маркеры возбудителей чумы, псевдотуберкулеза, холеры, бруцеллеза*: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. Иркутск; 2000.
3. Афанасьев М.В., Чипанин Е.В., Шестаков В.Е., Денисов А.В., Фомина Л.А., Остяк А.С. и др. Разработка и использование ПЦР-системы в режиме реального времени для детекции *Yersinia pestis* в полевом материале. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 3: 38—41.
10. *Инструкция по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного и холерного микроба*. Саратов; 1982.
16. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяк А.С., Витязева С.А., Корзун В.М. и др. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 1: 60—5.

REFERENCES

1. Onishchenko G.G., ed. *Natural foci of plague of Caucasus, Caspian, Central Asia and Siberia*. Moscow: Meditsina; 2004. (in Russian)
2. Balakhonov S.V. *Genomic markers of plague, pseudotuberculosis, cholera, and brucellosis pathogens*. Diss. Irkutsk; 2000. (in Russian)
3. Afanas'ev M.V., Chipanin E.V., Shestakov V.E., Denisov A.V., Fomina L.A., Ostyak A.S. et al. The development and implementation of polymerase chain reaction to detect in real-time operation mode *Yersinia pestis* in field material. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 3: 38—41. (in Russian)
4. Chase C.J., Ulrich M.P., Wasieloski L.P. Jr., Kondig J.P., Garrison J., Lindler L.E. et al. Real-time PCR assays targeting a unique chromosomal sequence of *Yersinia pestis*. *Clin. Chem.* 2005; 51: 1778—85.
5. Radnedge L., Chin S.G., McCreedy P.M., Worsham P.L., Andersen G.L. Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67: 3759—62.
6. Zhou D., Han Y., Dai E., Pei D., Song Y., Zhai J. et al. Identification of signature genes for rapid and specific characterization of *Yersinia pestis*. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48: 263—9.
7. Seng P., Drancourt M., Gouret F., La Scola B., Fournier P.E., Rolain J.M. et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49 (4): 552—3.
8. Karas M., Bahr U. Laser desorption ionization mass spectrometry of large biomolecules. *Trends Anal. Chem.* 1990; 9 (10): 321—5.

9. "MALDI Biotyper 3.0 User Manual. Rev 2" (Bruker Daltonics, Germany. Feb., 2011).
10. *Instructions for the control of specific sterility of experimental drugs prepared from cultures of the plague and cholera microbe.* Saratov; 1982. (in Russian)
11. Couderc C., Nappes C., Drancourt M. Comparing inactivation protocols of Yersinia organisms for identification with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012; 26: 710—4.
12. Drevinek M., Dresler J., Klimentova J., Pisa L., Hubalek M. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 2012; 55: 40—6.
13. Wittwer M., Heim J., Schär M., Dewarrat G., Schürch N. Tapping the potential of intact cell mass spectrometry with a combined data analytical approach applied to *Yersinia spp.*: detection, differentiation and identification of *Y. pestis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 2011; 34: 12—9.
14. Lasch P., Drevinek M., Nattermann H., Grunow R., Stämmle M., Dieckmann R. et al. Characterization of Yersinia using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. *Anal. Chem.* 2010; 82: 8464—75.
15. Ayyadurai S., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. Rapid identification and typing of Yersinia pestis and other Yersinia species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 285.
16. Balakhonov S.V., Afanasiev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vityazeva S.A., Korzun V.M. et al. The first case of allocation of Yersinia pestis subsp. pestis in the Altai mountain natural focus of plague. Message 1. Microbiological characterization of molecular-genetic and mass spectrometric identification of the isolate. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2013; 1: 60—5. (in Russian)

Поступила 14.12.13

Received 14.12.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.832-001-06:616.24-002-022.7-078

Ульянов В.Ю.¹, Определенцева С.В.¹, Швиденко И.Г.², Норкин И.А.¹, Коршунов Г.В.¹, Гладкова Е.В.¹

БИОЛОГИЧЕСКАЯ КИНЕТИКА БИОПЛЕНК КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS И PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ВЫДЕЛЕННЫХ У БОЛЬНЫХ С БРОНХОЛЕГОЧНЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ ПРИ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СПИННОГО МОЗГА

¹ФГБУ "Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии" Минздрава России, 410002, Саратов;²ГБОУ ВПО "Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского" Минздрава России, 410012, Саратов

В статических условиях культивирования в течение 24, 48, 72 и 96 ч изучена способность и интенсивность формирования микробных биопленок у 24 клинических штаммов Staphylococcus aureus и Pseudomonas aeruginosa, выделенных у больных с бронхолегочными инфекционными осложнениями в остром и раннем периодах травматической болезни спинного мозга.

Ключевые слова: бактериальные биопленки; золотистый стафилококк; синегнойная палочка; бронхолегочные осложнения; травматическая болезнь; спинной мозг.

V.Yu. Uliyanov¹, S.V. Opredelentseva¹, I.G. Shvidenko², I.A. Norkin¹, G.V. Korshunov¹, E.V. Gladkova¹

THE BIOLOGICAL KINETICS OF BIOFILMS OF CLINICAL STRAINS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND PSEUDOMONAS AERUGINOSA SEPARATED FROM PATIENTS WITH BRONCHOPULMONARY COMPLICATIONS UNDER TRAUMATIC DISEASE OF SPINAL CORD

¹The Saratov research institute of traumatology and orthopedics of Minzdrav of Russia, 410012 Saratov, Russia²The V.I. Razumovskiy Saratov state medical university of Minzdrav of Russia, 410012 Saratov, Russia

The capacity and intensity of formation of microbial biofilms was analyzed in 24 strains of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in static conditions of cultivation during 24, 48, 72 and 96 hours. The microorganisms were separated from patients with bronchopulmonary infectious complications in acute and early periods of traumatic disease of spinal cord.

Key words: bacterial biofilm; Staphylococcus aureus; Pseudomonas aeruginosa; bronchopulmonary complication; traumatic disease; spinal cord.

Бактериальные инфекции нижних дыхательных путей, вызванные условно-патогенными возбудителями, являются наиболее ранними осложнениями, развивающимися в остром и раннем периодах травматической болезни спинного мозга [1, 2]. Возникновение гнойно-воспалительных осложнений в бронхиальном дереве у больных с травматическими повреждениями шейного отдела позвоночника и спинного мозга обусловлено выраженным неврологическим дефицитом, характеризующимся параличом диафрагмы и других вспомогательных дыхательных мышц [3]. Неврологический дефицит в посттравматическом периоде приводит к неэффективной экспекторации, нарушениям мукоцилиарного клиренса, умень-

шению резистентности и инфицированию слизистой оболочки нижних дыхательных путей [4]. Среди возбудителей бронхолегочных осложнений наибольшее клиническое значение в посттравматическом периоде имеют *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, общим свойством которых является высокая патогенность, обусловленная наличием межклеточной сигнальной системы quorum sensing и способностью микроорганизмов к биопленкообразованию [5—7]. Способность к формированию биопленки определяется не только видом возбудителя, но и характером инфекционного процесса (аспирационный пневмонит, постинтубационные осложнения, функционирующая трахеостома, эндопневмония), развивающегося на фоне иммуносупрессии и синдрома системного воспалительного ответа [8—10]. В основе патогенеза бронхолегочных инфекционных осложнений при травматической болезни спинного мозга лежит переход от планктонного фенотипа микроорганизмов к формированию

Для корреспонденции:

Ульянов Владимир Юрьевич, науч. сотр.

Адрес: 410002, Саратов, ул. Чернышевского, 148.

E-mail: v.u.ulyanov@gmail.com