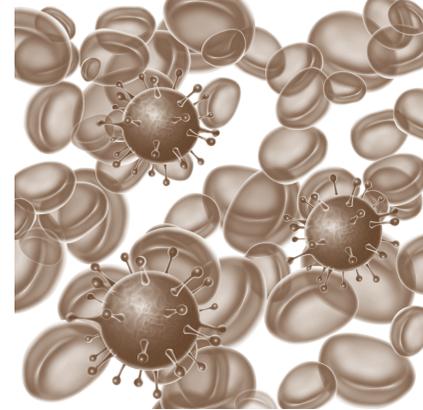


Применение времяпролетной масс-спектрометрии для диагностики бруцеллеза и межвидовой дифференциации штаммов *Brucella* spp.



Ульшина Д.В.,
Ковалев Д.А.,
Бобрышева О.В.,
Пономаренко Д.Г.,
Русанова Д.В.,
Ковалева Н.И.,
Куличенко А.Н.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Цель исследования – определить возможность применения времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для диагностики острого бруцеллеза на основе анализа особенностей белковых профилей крови больных бруцеллезом людей и оценить эффективность использования MALDI-TOF MS для межвидовой дифференциации штаммов бруцелл.

Материал и методы. В работе приведены результаты исследования крови больных с клиническим диагнозом «острый бруцеллез» ($n=18$) и условно здоровых людей ($n=30$) с помощью времяпролетной масс-спектрометрии. Изучены белковые профили 69 штаммов 6 видов бруцелл (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*). В работе использованы бактериологические, масс-спектрометрические, биоинформационные, статистические методы.

Результаты. Предложена методика обеззараживания и пробоподготовки крови для последующего анализа при использовании MALDI-TOF MS. В результате сравнительного анализа белковых профилей образцов крови больных бруцеллезом людей было охарактеризовано 27 общих сигналов, в том числе 7 родоспецифичных для бруцелл ($m/z \pm 5$ Да): 2422, 3268, 3336, 3696, 5360, 6672, 7048, позволяющих отличать их от масс-спектров условно здоровых людей.

Изучено 69 репрезентативных белковых профилей представителей 6 видов бруцелл, которые включены в электронную базу данных масс-спектров в среде программы Biopyper v 3.0 (Bruker Daltonics, Германия). Показана эффективность применения многомерного шкалирования и пакета RGL в среде языка R для межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза на основе масс-спектрометрических данных.

Заключение. Подтверждена возможность выявления специфичных маркеров возбудителя бруцеллеза в крови больных с клиническим диагнозом «острый бруцеллез» методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце на стадии пробоподготовки. Продемонстрирована перспектива применения прикладных пакетов в среде языка R для биоинформационной обработки данных времяпролетной масс-спектрометрии белковых экстрактов культур в целях межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза, имеющих клиническое значение.

Ключевые слова:

бруцеллез, лабораторная диагностика, масс-спектрометрия, белковое профилирование, видовая дифференциация

Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018. Т. 7, № 4. С. 15–24.

doi: 10.24411/2305-3496-2018-14002.

Статья поступила в редакцию: 19.06.2018. Принята в печать: 09.10.2018.

The use of time-of-flight mass spectrometry for diagnosis of brucellosis and interspecific differentiation of strains of *Brucella* spp.

Ulshina D.V., Kovalev D.A.,
Bobrisheva O.V., Ponomarenko D.G.,
Rusanova D.V., Kovaleva N.I.,
Kulichenko A.N.

Stavropol Plague Control Research Institute

The aim is to determine the possibility of using time-of-flight mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF MS) for the diagnosis of acute brucellosis based on the analysis of the protein profiles of patients with human brucellosis and to evaluate the effectiveness of using MALDI-TOF MS for interspecific differentiation of strains of the brucellosis microbe.

Material and methods. The paper presents the results of a study of the blood of patients with a clinical diagnosis of acute brucellosis ($n=18$) and conditionally healthy people ($n=30$) using time-of-flight mass spectrometry. The protein profiles of 69 strains of 6 brucella species (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*) have been studied.

Bacteriological, mass-spectrometric, bioinformatics, and statistical methods were used in the work.

Results. A method for decontamination and sample preparation of blood is proposed for subsequent analysis using MALDI-TOF MS. As a result of the comparative analysis of the protein profiles of the samples of patients with human brucellosis, 27 common signals were characterized, including 7 specific for *Brucella* ($m/z \pm 5$ Da): 2422, 3268, 3336, 3696, 5360, 6672, 7048, which discriminate them from the mass spectra of conditionally healthy people.

69 representative protein profiles of representatives of 6 brucella species were studied, which are included in the electronic database of mass spectra in the environment of the Biotyper v 3.0 program (Bruker Daltonics, Germany). The effectiveness of multidimensional scaling and the RGL package in the R language environment for the interspecies differentiation of strains of the brucellosis pathogen on the basis of mass spectrometric data is shown.

Conclusion. The possibility of identifying specific markers of the causative agent of brucellosis in the blood of patients with a clinical diagnosis of acute brucellosis by the MALDI-TOF MS method without the stage of isolation of pure culture or accumulation of pathogens in the sample at the stage of sample preparation was confirmed. The perspectives of application of applied packages in the environment of the R language for bioinformatical processing of time-of-flight mass spectrometry data of protein extracts of cultures for the purpose of interspecies differentiation of strains of brucellosis causative agent of clinical significance are demonstrated.

Keywords:

brucellosis, laboratory diagnostics, mass spectrometry, protein profiling, species differentiation

Infectious Diseases: News, Opinions, Training. 2018; 7 (4): 15–24.

doi: 10.24411/2305-3496-2018-14002.

Received: 19.06.2018. Accepted: 09.10.2018.

Бруцеллез – зоонозная инфекция, вызываемая бактериями рода *Brucella* (*B.*), передающимися от животных к человеку через зараженные бруцеллами молочные и мясные продукты, прямой контакт с больными бруцеллезом животными или при вдыхании пылевого аэрозоля, загрязненного возбудителем. Известно, что бактерии рода *Brucella* относят к внутриклеточно паразитирующим микроорганизмам, современная систематика которых насчитывает 12 видов: *B. abortus*, *B. canis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. melitensis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata*, *B. papionis*, *B. vulpis*. Наибольшее эпидемиологическое значение имеют бруцеллы видов *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*.

Бруцеллез людей в Российской Федерации регистрируется ежегодно. Наиболее эпидемиологически неблагополучными по бруцеллезу являются административные субъекты с развитым животноводством (Северо-Кавказский, Южный и Сибирский федеральные округа), на долю которых в последние 5 лет приходилось от 70 до 90% заболеваний бруцеллезом [1]. Следует отметить, что 80% всего поголовья крупного (КРС) и мелкого рогатого скота (МРС) и 90% регистрируемых случаев бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных также приходится на долю этих федеральных округов [2]. В Северо-Кавказском федеральном округе 80% МРС и 50% КРС содержатся в индивидуальных и крестьянско-фермерских хозяйствах.

Лабораторная диагностика бруцеллеза включает бактериологический, иммуносерологические, аллергологические и молекулярно-генетические методы [3].

Регламентированные методы видовой идентификации – анализ потребности в CO_2 при культивировании, выработки H_2S , устойчивости к фуксину и тионину, способности агглютинироваться монорецепторными сыворотками, чувствительности к фагу «Тб», отличаются достаточной длительностью и трудоемкостью. Данные методы, основанные на изучении фенотипических свойств, имеют существенные недостатки, связанные с относительной однородностью фенотипических свойств штаммов возбудителя бруцеллеза, что определяет трудности в их межвидовой дифференциации [4–6].

В последнее десятилетие помимо традиционных методов идентификации чистых культур бактерий (бактериологические, иммуносерологические), используют молекулярно-генетические подходы, которые значительно расширяют возможности лабораторной диагностики инфекций, позволяя напрямую определять ДНК патогена в анализируемом материале [7]. Наблюдается интеграция MALDI-TOF масс-спектрометрии в систему традиционных схем индикации и идентификации бруцелл [8, 9].

В настоящее время сформировались 2 основных направления применения MALDI-TOF масс-спектрометрии в лабораторной диагностике бруцеллеза: первое – идентификация культур возбудителя бруцеллеза на основе сравнения белковых профилей со спектрами из базы данных референсных штаммов; второе – индикация бруцелл в образцах крови после этапа биологического обогащения исследуемого материала.

Пакет программ BioTyper (Bruker Daltonics, Германия) обеспечивает идентификацию микроорганизма путем сравнения полученного масс-спектра с архивированными в базе данных суперспектрами. В зарубежных источниках литературы встречаются сообщения о возможности использования крови и цереброспинальной жидкости в протеомном профилировании для диагностики инфекционных болезней [10]. При этом прямая идентификация бактерий методом MALDI-TOFMS с помощью программного пакета BioTyper возможна только до рода, реже до вида [11]. Низкие значения Score (коэффициент совпадения полученного масс-спектра с референсным из базы данных) при анализе экстрактов контаминированных образцов, в том числе клинических, вероятно, обусловлены присутствием в исследуемом материале фракций основных небактериальных белков, существенно влияющих на качество масс-спектров. Таким образом, в настоящее время выявление возбудителя бруцеллеза в экстрактах клинических образцов биологических жидкостей методом MALDI-TOFMS с использованием программы BioTyper неэффективно.

Описано применение метода MALDI-TOF MS для идентификации бруцелл до уровня рода, полученных в виде чистых культур на твердой питательной среде с использованием наборов MALDI Sepsityper Kit (Bruker Daltonics). Точная видовая идентификация возбудителя бруцеллеза при помощи указанного набора и соответствующего программного обеспечения (ПО) оказалась затруднительной [12].

Одно из активно развивающихся направлений протеомных исследований – изучение возможности применения

MALDI-TOF MS для выявления возбудителей инфекционных болезней, в том числе бруцелл, в клинических или иных контаминированных образцах без этапа выделения чистой культуры или увеличения бактериальной массы на стадии пробоподготовки [13]. При этом следует отметить, что метод MALDI-TOF MS для исследования клинических образцов при диагностике бруцеллеза имеет ряд ограничений, которые связаны в том числе с низкой концентрацией возбудителя в материале [14, 15]. Сложность интерпретации полученных MALDI-TOF MS масс-спектров при анализе клинических образцов обусловлена существенной вариабельностью качественного и количественного состава белковых профилей аналитов, полученных от различных индивидуумов. В качестве эффективного решения указанной проблемы исследователями предложены различные способы предварительной подготовки проб: концентрирование, фракционирование, удаление мажорных фракций белков, селективное удаление небелковых примесей и др. [16].

Ранее предложена схема идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF MS, основанная на выявлении группы родоспецифичных фрагментов в диапазоне масс 2–20 кДа ($m/z \pm 5$ Да): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068 [17]. Возможность применения этого подхода для выявления возбудителя бруцеллеза в белковых экстрактах клинических образцов не изучена.

Видовая дифференциация и субтипирование изолятов бруцеллеза из очагов инфекции на конкретных территориях имеет важное эпидемиологическое значение с точки зрения классификации очагов, оценки степени напряженности эпизоотического процесса, выявления путей распространения возбудителя, выбора тактики лечения и др.

A. Karger [18] проанализировал евклидовы расстояния между видами и биоварами изолятов *Brucella* spp., полученные методом MALDI Biotyper на основе MSP-спектров и в среде языка статистического программирования R, выявил ряд разногласий между полученными результатами и классической таксономией, основанной на фенотипических признаках. При этом для штаммов *B. abortus* и *B. melitensis* получены сходные спектры, что затруднило однозначную дискриминацию представителей этих видов. Для дифференциации белковых профилей штаммов *B. canis*, *B. ovis* и *B. suis* (биовар 3 и 4) предложено использовать статистическое моделирование на основе метода главных компонент. Учитывая ошибочные результаты идентификации видов и биоваров бруцелл при анализе с помощью MALDI Biotyper, автор предложил использовать статистическое моделирование на основе коммерческого ПО ClinProTools (Bruker Daltonics, Германия). В качестве основных ограничений для эксплуатации этого подхода выступают относительно высокая стоимость ПО и расходных материалов, необходимость стандартизации условий культивирования штаммов бруцелл и протоколов пробоподготовки.

Таким образом, в настоящее время внедрение MALDI-TOF масс-спектрометрии в систему лабораторной диагностики бруцеллеза требует разработки стандартизированных подходов к пробоподготовке, формированию и оценке масс-спектров, интерпретации полученных результатов.

Цель работы – определение возможности применения времяпролетной масс-спектрометрии для диагностики острого бруцеллеза с оценкой эффективности использования MALDI-TOF масс-спектрометрии для межвидовой дифференциации штаммов бруцеллезного микроба.

Материал и методы

В работе использовали культуры бруцелл 6 видов (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*) из коллекции микроорганизмов Ставропольского противочумного института. Всего исследованы 69 штаммов бруцелл: 20 штаммов *B. abortus*. (из них 1 вакцинный и 6 референсные), 19 штаммов *B. melitensis* (включая 1 вакцинный штамм и 2 референсных), 4 штамма *B. ovis*, 18 штаммов *B. suis* (среди них 3 референсных штамма), 3 штамма *B. canis* и 5 штаммов *B. neotomae*.

Методика получения белковых экстрактов культур бруцелл

Работу с исследуемым материалом, подозрительным на зараженность микроорганизмами I–II групп патогенности, проводили в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» [19].

Одну бактериологическую петлю 48-часовой культуры возбудителя бруцеллеза, выращенной на агаре Альбими, эмульгировали в 300 мкл ультрачистой воды. Все дальнейшие этапы проводили в боксе биологической безопасности класса III или II-B. К полученной суспензии добавляли 900 мкл спирта этилового 95% и перемешивали. Полученную смесь инкубировали при температуре 30 °С в течение 90 мин. После проведенной инактивации образцы суспензии центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин, супернатант удаляли. Для полного удаления спирта процедуру центрифугирования повторяли.

После инактивации проб вышеописанным способом дальнейшие исследования проводили так же, как с обеззараженным материалом.

Клинический материал

В качестве объекта исследования использовали стабилизированную гепарином венозную кровь от 30 условно здоровых людей и от 18 больных с клиническим диагнозом «острый бруцеллез», поступивших в отделение по диагностике, лечению и экспертизе профпатологии бруцеллеза ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2» г. Ставрополя. Кровь отбирали в емкости для взятия венозной крови Vacutainer (Becton Dickinson International, США).

Питательные среды, реактивы

Вода ультрачистая, тип I по ASTM (система Millipore, США), спирт этиловый 96% (ГОСТ Р 51723-2001), кислота муравьиная ~98% (Sigma-Aldrich, США), ацетонитрил, степень чистоты «для ВЭЖХ-МС» (Sigma-Aldrich, США), α -циано-4-гидроксикоричная кислота, степень чистоты для масс-спектрометрии (Sigma-Aldrich, США), трифторуксусная кислота >99% (Sigma-Aldrich, США), бактериальный тест-

стандарт MBT для внутренней калибровки масс-спектрометра (Bruker Daltonics, Германия). Бруцелла-агар (pH 7,2, прочность 300–380 г по Валенту, содержание аминного азота 100–120 мг %).

Подготовка проб и обеззараживание

Аликвоты (2 мл) стабилизированной гепарином крови центрифугировали при 2000 об/мин в течение 2 мин, надосадочную жидкость удаляли. Полученный осадок, содержащий форменные элементы крови, разбавляли многократно дистиллированной водой с последующей инкубацией (10 мин) и центрифугированием до полного удаления эритроцитов. Освобождение от эритроцитов проводили до полного обесцвечивания получаемого в ходе промывки супернатанта. Суспензию отмытых лейкоцитов переносили в чистые микроцентрифужные пробирки и центрифугировали с удалением супернатанта при 15 500 об/мин 10 мин.

Обеззараживание полученной лейкоцитарной массы, а также культур возбудителя бруцеллеза выполняли 70% этиловым спиртом по методике, описанной ранее F. Lista и соавт. [20]. Инактивированные вышеуказанным способом образцы ресуспендировали в 100 мкл кислоты муравьиной 70% и 100 мкл ацетонитрила с последующим осаждением центрифугированием в течение 4 мин при 14 000 об/мин при температуре 10 °С.

1 мкл обеззараженного образца помещали на пластину-мишень (Bruker Daltonics, Германия) из нержавеющей стали и высушивали на воздухе. Затем на высушенный образец наносили 1 мкл матрицы, состоящей из α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в растворе, содержащем 500 мкл ацетонитрила, 475 мкл ультрачистой воды и 25 мкл трифторуксусной кислоты, и сушили на воздухе. Таким образом, достигалась гомогенность полученных образцов, что обеспечило высокую воспроизводимость (>95%) при получении масс-спектров в автоматическом режиме. При проведении масс-спектрометрического анализа проб, хранившихся до 3 сут при температуре -18–20 °С, изменений основных характеристик сигналов масс-спектров для серий повторных измерений не выявлено.

Получение масс-спектров

Масс-спектры получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия) при следующих параметрах: частота лазера – 60 Гц, интенсивность лазера – 10–50%, время задержки экстракции – 110 нс P1E, напряжение первого источника ионов – 19,4 кВ, второго – 17,3 кВ, напряжение фокусирующей линзы – 8 кВ, напряжение линейного детектора – 2500 кВ, диапазон масс – 2–20 кДа. Внутреннюю калибровку ранее указанного диапазона проводили с использованием точных значений масс бактериального тест-стандарта MBT (Bruker Daltonics, Германия). Каждый масс-спектр генерировали из 500 лазерных выстрелов (10×50 лазерных выстрелов с разных позиций каждой капли мишени). Для управления масс-спектрометром, включая установку режимов работы и регистрации масс-спектров, использовали программный пакет Daltonicsflex Controlv 3.3.64 (Bruker Daltonics, Германия), для предварительной оценки интенсивности и разре-

шения пиков в спектре – flexAnalysisv 3.3.65. Формирование промежуточных таблиц проводили с использованием программных ресурсов пакета Microsoft Office 2010. Визуализацию и анализ полученных масс-спектров осуществляли с помощью интегрированных инструментов программного пакета MALDI Biotyper, а также в среде языка R[(<https://cran.r-project.org/>),(<https://cran.r-project.org/web/packages/rgl/index.html>)]. Многомерное шкалирование проводили в программе Statistica v 10.0 (Statsoft Inc., США) [<http://statsoft.ru/home/textbook/default.htm>].

Статистическая обработка данных

Для математико-статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica v 10.0 (Statsoft Inc., США). Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения (M) \pm стандартное отклонение (SD). Анализ групповых различий оценивали по t -критерию Стьюдента для несвязанных выборок при 95% уровне значимости. Различия между выборками считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе настоящего исследования был проведен MALDI-TOFMS анализ проб крови 30 условно здоровых человек и 18 больных бруцеллезом. Каждый образец исследовали в 3 повторах. Типичные масс-спектры представлены на рис. 1.

Выявление особенностей белковых профилей крови больных бруцеллезом проводили путем сравнительного анализа полученных масс-спектрометрических характеристик со спектрами экстрактов крови условно здоровых людей и референсных штаммов бруцелл из базы данных

в среде программы Biotyper, полученными ранее на базе ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора» [17].

В рамках исследования была разработана методика прободготовки крови, подозрительной на содержание возбудителя бруцеллеза, включающая обеззараживание, очистку и экстракцию лейкоцитарной фракции. На основе экспериментальных данных установлено, что использование белковых экстрактов лейкоцитарной фракции крови позволяет значительно повысить эффективность анализа по сравнению с исследованием супернатанта при выявлении возбудителя бруцеллеза в крови методом MALDI-TOF MS. Для каждой пробы крови больного с клиническим диагнозом «острый бруцеллез» было параллельно получено по 3 образца супернатанта и лейкоцитарной фракции. В частности, при исследовании пик-листов масс-спектры лейкоцитарной фракции, как правило, более представительны (в среднем на $20 \pm 2\%$), что может быть связано с чрезвычайно низкой концентрацией возбудителя в полученном после центрифугирования супернатанте. В результате сравнительного анализа белковых профилей лейкоцитарной фракции, выделенной из цельной крови, было установлено, что интенсивность сигналов родоспецифичных фрагментов бруцелл на 30–40% превосходит аналогичные параметры сигналов на масс-спектрах, полученных из супернатанта.

Полученные данные масс-спектрометрического анализа белковых экстрактов лейкоцитарной фракции образцов крови условно здоровых людей были использованы при формировании суммарного пик-листа [супер-спектр MSP (англ. main spectrum)], полученного усреднением серии единичных спектров, что позволяет добиться большей точности и воспроизводимости метода. Общее количество зареги-

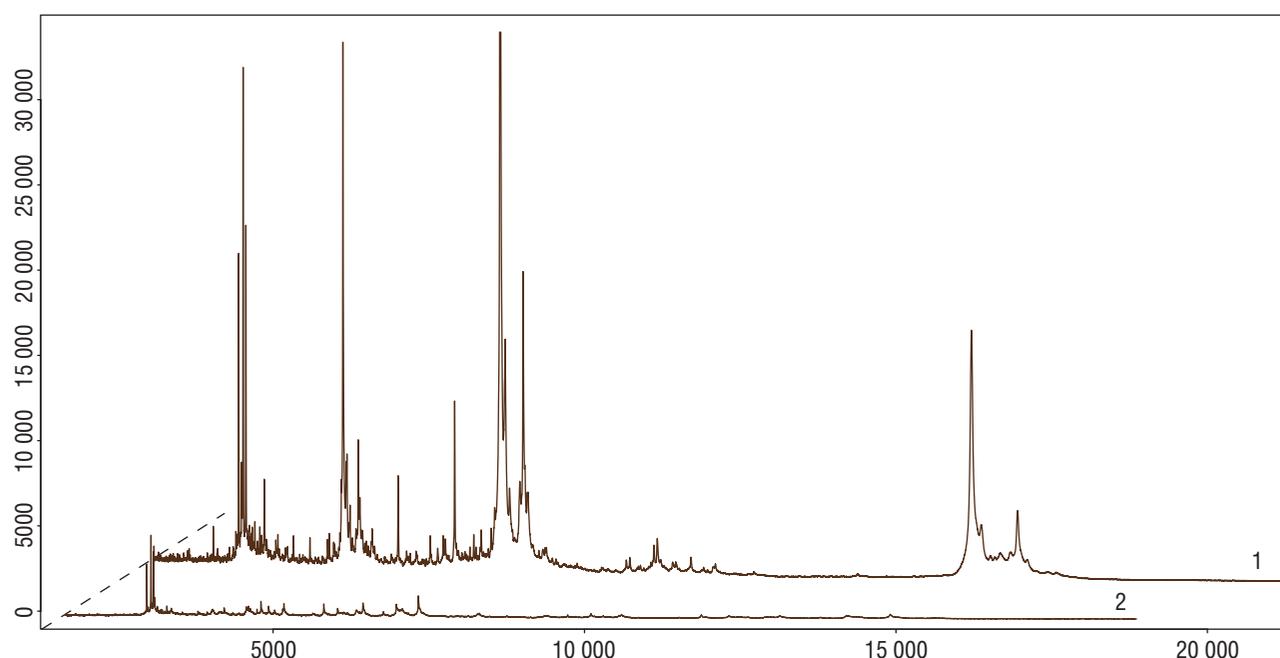


Рис. 1. Масс-спектрометрические профили белковых экстрактов лейкоцитарной фракции больного бруцеллезом (1) и условно здорового человека (2)

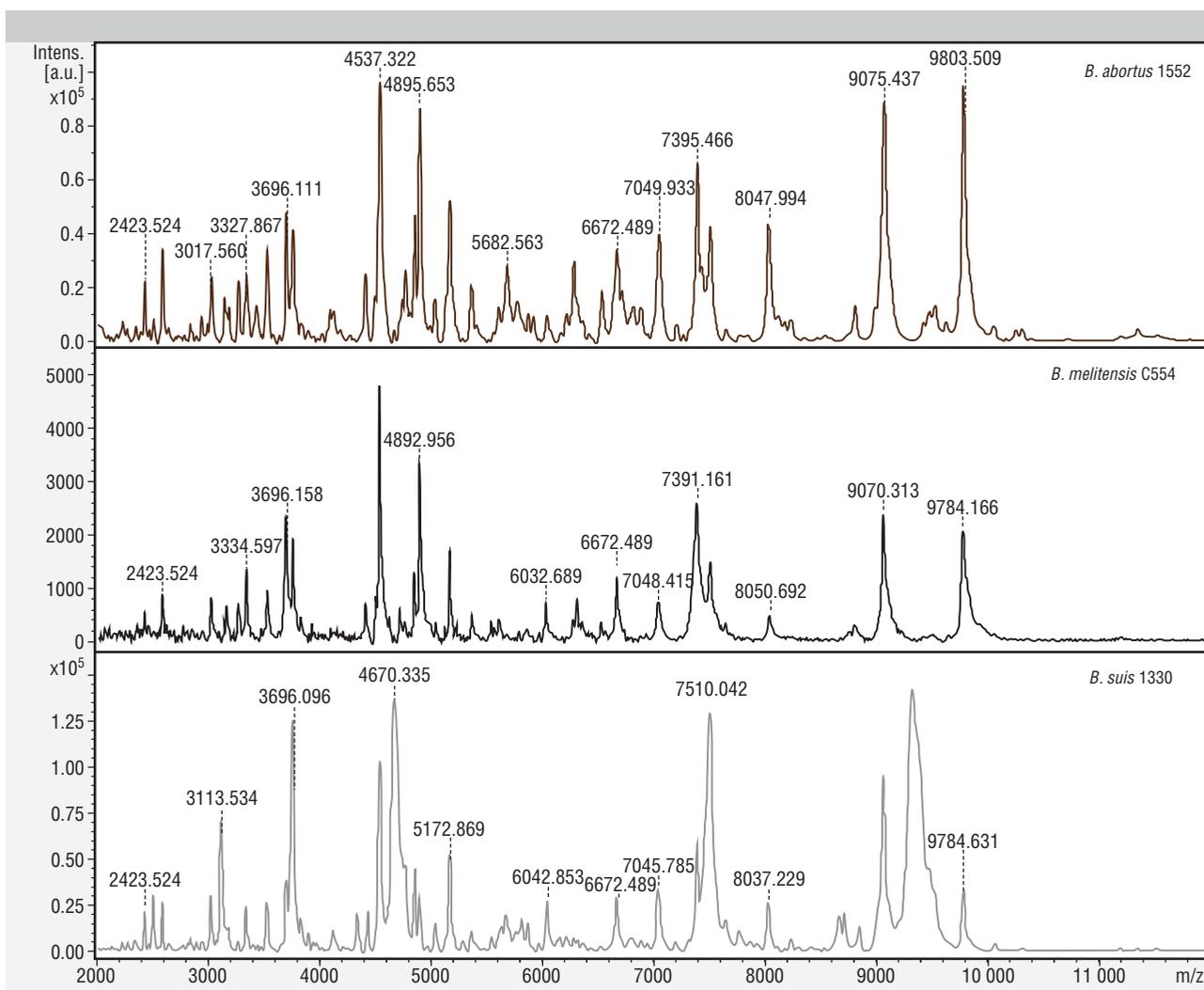


Рис. 2. Фрагменты масс-спектрометрических профилей белковых экстрактов культур возбудителя бруцеллеза

стрированных пиков на масс-спектрах экстрактов лейкоцитарной фракции больных бруцеллезом существенно варьировало (117 ± 15) в рассматриваемом интервале значений масс 2–20 кДа.

На масс-спектрах экстрактов крови больных бруцеллезом выявлена совокупность из 27 общих, отсутствующих на масс-спектрах контрольной группы, отличающихся по абсолютной интенсивности аналитически значимых сигналов ($m/z \pm 5$ Да): 2014, 2085, **2422**, **3268**, **3336**, **3696**, 4025, 4124, 4156, 4252, 4516, 4914, **5360**, 5499, 5558, 5940, **6672**, 6860, **7048**, 7147, 7566, 7885, 8311, 9824, 10039, 15132, 15873. При этом указанная группа фрагментов содержала сигналы (отмечены полужирным курсивом), характерные (родоспецифичные) для бруцелл. Фрагменты типичных белковых профилей культур возбудителя бруцеллеза представлены на рис. 2.

Частота встречаемости этого комплекса из 7 сигналов в масс-спектрах экстрактов крови больных бруцеллезом составила 72,2%, в то время как пик-листы остальных 27,8% масс-спектров соответствующих образцов содержали 6 из 7 описанных фрагментов в разных сочетаниях. Другие 20 из отмеченных общих сигналов не характерны для профилей условно здоровых людей и масс-спектров культур микро-

организмов *Brucella* spp. Вероятно, эти фрагменты неспецифичны и могут быть ассоциированы с протеканием острых иммуновоспалительных процессов в организме больного бруцеллезом.

На основе результатов проведенного анализа установлено, что для каждого из 27 указанных сигналов на масс-спектрах 18 исследованных образцов отмечалось существенное изменение количественных характеристик. Максимальная интенсивность была зарегистрирована для сигналов ($m/z \pm 5$ Да): 7566 (24730 ± 20247 a.i.) и 15132 (9432 ± 5380 a.i.). Интенсивность остальных фрагментов изменялась в относительно узком диапазоне (2500 ± 2000 a.i.). Вместе с тем интенсивность специфичных для микроорганизмов *Brucella* spp. фрагментов изменялась в следующем диапазоне ($m/z \pm 5$ Да): **2422** (от 278 до 3668 a.i.), **3268** (от 1101 до 8272 a.i.), **3336** (от 597 до 13140 a.i.), **3696** (от 333 до 3895 a.i.), **5360** (от 322 до 3192 a.i.), **6672** (от 275 до 2517 a.i.), **7048** (от 251 до 1993 a.i.). Наибольшие значения отношения сигнал/шум отмечены для следующих сигналов ($m/z \pm 5$ Да): **3268** (23 ± 19), 4516 (19 ± 10) и 7566 (12 ± 5). Разрешение пиков (R) для общих сигналов на масс-спектрах экстрактов крови больных бруцеллезом находилось в диапа-

зоне 451±50. Характеристики указанных сигналов, возможно, коррелируют с концентрацией возбудителя в крови больного бруцеллезом. Однако при высокой вариабельности параметров основных сигналов во всех клинических образцах больных с установленным диагнозом «острый бруцеллез» были выявлены фрагменты, родоспецифичные для микроорганизмов рода *Brucella* (получен положительный результат).

При сопоставлении данных, полученных с помощью регламентированных методов диагностики (полимеразная цепная реакция, бактериологический метод) и MALDI-TOF MS анализа проб крови больных бруцеллезом людей, ни для одного из исследованных образцов не получен положительный результат всеми тремя методами [отчет о работе Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза <http://www.spipchi.ru/updoc/2018/Bruczellez-2017.pdf>]. Применение бактериологического метода позволило выделить культуры бруцелл в 23% от общего количества образцов, наличие ДНК возбудителя бруцеллеза методом ПЦР установлено в 66,7% проб.

На следующем этапе работы были изучены масс-спектры белковых экстрактов 69 штаммов возбудителя бруцеллеза (перечень штаммов *Brucella* spp. представлен в разделе «Материал и методы»). Сглаживание и коррекцию базовой линии

на масс-спектрах проводили с использованием flexAnalysis (Bruker Daltonics GmbH, Германия). При этом отмечена высокая степень сходства полученных белковых профилей, а также присутствие на них некоторых из описанных ранее Ferreira и соавт. общих для бруцелл сигналов ($m/z \pm 5$ Da): 2426, 2585, 3337, 3754, 3680, 5168, 6672, 7042, 9074, 9103, 9787 [13].

Анализ полученных спектров в базе данных Biotyper-DBv 3.1.2 показал низкие значения Score (<1,397) для всех штаммов возбудителя бруцеллеза относительно других микроорганизмов [общее количество – более 4600 штаммов (2185 видов, 364 родов) бактерий, грибов и др.], на основании чего был сделан вывод о специфичности исследуемых белковых профилей. В то же время сравнение коллекции масс-спектров штаммов бруцелл между собой подтвердило высокую степень сходства белковых профилей изучаемых бактерий (Score 1,946–2,845).

Кластерный анализ масс-спектров культур возбудителя бруцеллеза с использованием интегрированных инструментов программного пакета MALDI Biotyper позволил наглядно отобразить близость белковых профилей представителей разных видов *Brucella* spp. Как видно на дендрограмме (рис. 3), штаммы *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis* формируют смешанные группы в соответствии с их таксономическим

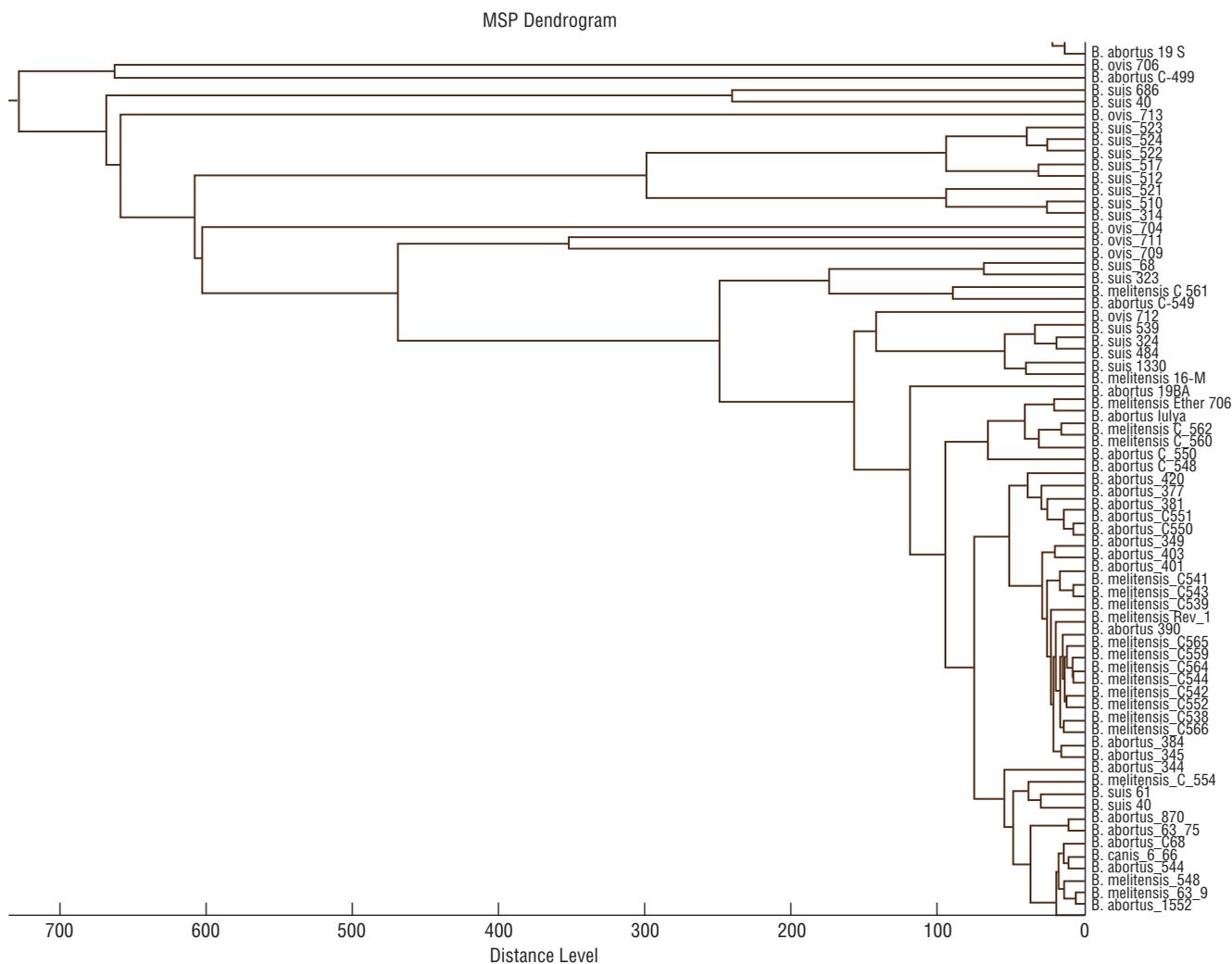


Рис. 3. MSP-дендрограмма масс-спектрометрических профилей штаммов возбудителя бруцеллеза

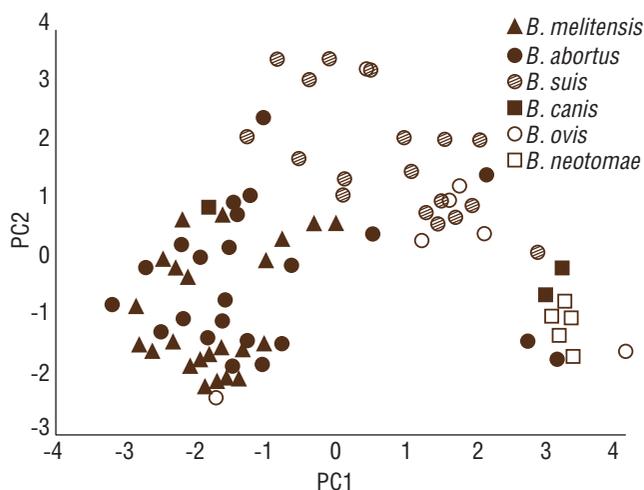


Рис. 4. Диаграмма распределения MS-профилей штаммов различных видов бруцелл по результатам анализа методом PCA: PC1 (первая главная компонента) – линейная комбинация исходных переменных, обладающая наибольшей дисперсией; PC2 (вторая главная компонента) – не коррелирована с PC1 и имеет наибольшую дисперсию по сравнению с остальными компонентами; значения на осях – координаты объектов в пространстве главных компонент

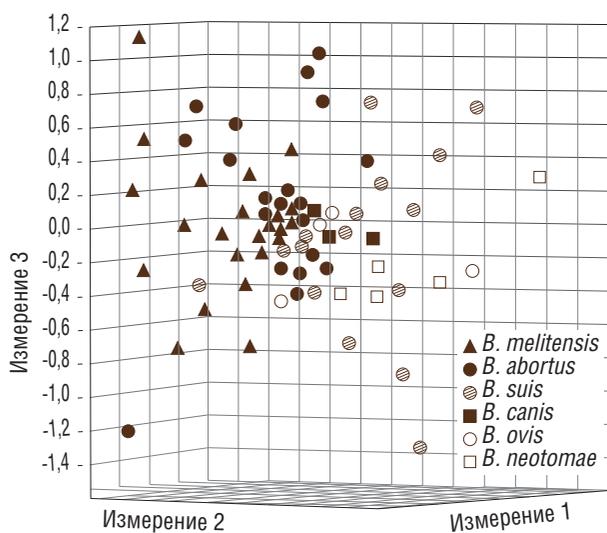


Рис. 5. Диаграмма распределения штаммов возбудителя бруцеллеза средствами MDS. Координатные оси (измерение 1, 2, 3) – факторы, определяющие расхождение между объектами в построенном пространстве: ось абсцисс – отсутствие/присутствие пика, ось ординат – значение m/z -сигнала, ось аппликата – интенсивность сигнала

положением. При этом штаммы *B. abortus* и *B. melitensis* располагаются в чередующихся соседних кластерах, что подтверждает близкое родство этих видов и согласуется с данными литературы [13].

Визуализация данных, основанная на использовании метода главных компонент (PCA от англ. principal component analysis), полученная средствами программного пакета MALDI Biotyper (рис. 4), отражает распределение штаммов возбудителя бруцеллеза разных видов в декартовой системе

координат. Однако детальный анализ показал, что подобное разделение не полностью согласуется с видовой принадлежностью исследуемых штаммов. В частности, отдельные кластеры включали не только штаммы *B. abortus* и *B. melitensis*, но и представителей других видов. Для штаммов *B. canis*, *B. ovis* и *B. suis* распределение на диаграмме также не соответствовало их видовой принадлежности.

В качестве альтернативного подхода для интерпретации полученных масс-спектрометрических данных использовали один из широко применяемых подходов для сравнительного анализа массивов данных – многомерное шкалирование (MDS от англ. Multidimensional Scaling), который не требует, чтобы исследуемые данные подчинялись многомерному нормальному распределению. В качестве исходных данных использовали произвольный тип матрицы сходства объектов. Результатом применения алгоритма MDS стали числовые значения координат, соответствующие каждому объекту в новой системе координат, с размерностью нового пространства признаков существенно меньшей по сравнению с размерностью исходного (рис. 5).

На диаграмме (см. рис. 5) представлены кластеры, образованные представителями разных видов возбудителя бруцеллеза. В качестве факторов, определяющих различия между кластерами, выступали координатные оси построенного пространства. Использование 3D-моделирования средствами MDS для пространственной визуализации представителей отдельных видов бруцелл на основании сходства/различий их белковых профилей имеет важное преимущество – распределение изучаемых профилей в 3D-пространстве с возможностью динамического изменения угла обзора. В построенной системе координат между представителями видов *B. abortus* и *B. melitensis* наблюдается относительно меньшая дистанция по сравнению с *B. suis*. В то же время для штаммов *B. neotomae* отмечена относительно большая близость с представителями вида *B. suis*.

В работе при интерпретации данных MALDI-TOF MS и относительно малых дистанционных расстояний при 3D-визуализации был апробирован прикладной пакет биоинформационного анализа RGL в среде языка R. В качестве исходных данных использовали пик-листы масс-спектров, обуславливающих особенности признаков для бруцелл разных видов. На рис. 6 представлена 3D-диаграмма рассеяния, полученная с помощью указанного пакета.

На 3D-диаграмме рассеяния, несмотря на существенные отличия масс-спектрометрических характеристик полученных белковых профилей, четко визуализируются 3 группы объектов, соответствующие штаммам *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, согласно их видовой принадлежности (направление движения по диаграмме слева направо). Наиболее удаленную группу составили представители *B. ovis*. Отмечена близость расположения штаммов *B. canis* и *B. neotomae* к группе *B. suis*. Однако возможно разделение указанных кластеров при изменении точки обзора.

Таким образом, в ходе проведенного исследования была подтверждена возможность выявления специфичных маркеров возбудителя бруцеллеза в клиническом материале методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце на стадии пробо-

подготовки. В результате сравнительного анализа белковых профилей образцов больных бруцеллезом людей было охарактеризовано 27 общих сигналов, в том числе 7 родоспецифичных для бруцелл ($m/z \pm 5$ Да): 2422, 3268, 3336, 3696, 5360, 6672, 7048, позволяющих проводить точную дифференциацию их от масс-спектров условно здоровых людей. Описанный комплекс родоспецифичных маркеров может быть в дальнейшем использован при разработке нового подхода для лабораторной диагностики бруцеллеза, основанного на методе масс-спектрометрии.

Полученные результаты демонстрируют эффективность применения прикладных пакетов в среде языка R для биоинформационной обработки данных времяпролетной масс-спектрометрии белковых экстрактов культур в целях межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза, имеющих клиническое значение: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*. Выявленные трудности межвидовой дифференциации штаммов на основе белкового профилирования близкородственных видов бруцелл требуют проведения дополнительных исследований, в том числе разработки новых алгоритмов биоинформационного анализа распределения частот встречаемости видоспецифичных маркерных пиков.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

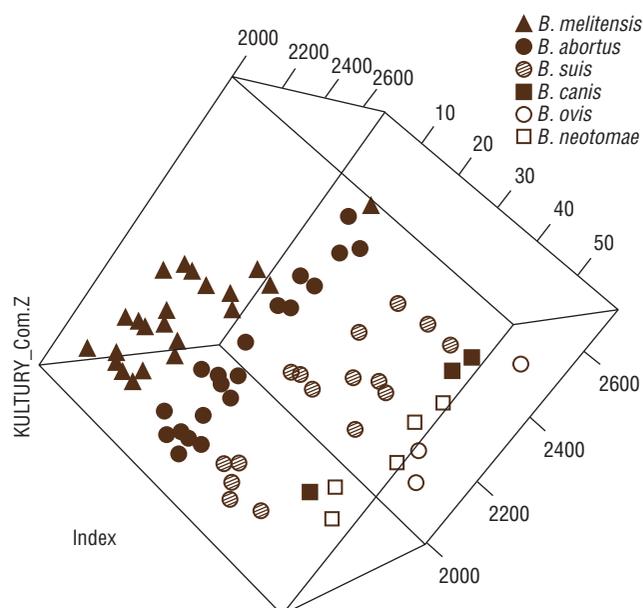


Рис. 6. 3D-диаграмма рассеяния, полученная с помощью пакета RGL в среде языка R

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора:

Ульшина Диана Васильевна – младший научный сотрудник лаборатории биохимии

E-mail: vladidiana@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Ковалев Дмитрий Анатольевич – кандидат химических наук, заведующий лабораторией биохимии

E-mail: kovalev_da.stv@list.ru

<http://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Бобрышева Ольга Викторовна – младший научный сотрудник лаборатории биохимии

E-mail: olc83@yandex.ru

Пономаренко Дмитрий Григорьевич – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией бруцеллеза

E-mail: ponomarenko.dg@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-0422-6755>

Русанова Диана Владимировна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории бруцеллеза

E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Ковалева Нина Ивановна – младший научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза

E-mail: ninakovaleva82@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0002-9974-2244>

Куличенко Александр Николаевич – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, директор

E-mail: stavnipchi@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

ЛИТЕРАТУРА

1. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Вилинская С.В. и др. Эпидемическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации и государствах – участниках Содружества Независимых Государств // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2016. № 1. С. 68–74.

2. Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Об эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2016 г. и прогноз на 2017 г. // Пробл. особо опасных инфекций. 2017. № 2. С. 23–27.

3. Методические указания по порядку организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: МУК 4.2.3010-12. М., 2012. 65 с.

4. Dixon P. et al. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015. Vol. 34, N 5. P. 863–876.

5. Kazemi S., Borzoueisileh S., Ebrahimpour S. Evaluation of brucellosis in patients and diagnostic tests // *Online J. Anim. Feed Res.* 2015. Vol. 4, N 3. P. 60–66.

6. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases // *Clin. Chem.* 2015. Vol. 61, N 1. P. 100–111.

7. Zamanian M., Hashemi Tabar G.R., Rad M. et al. Evaluation of different primers for detection of Brucella in human and animal serum samples by using PCR method // *Arch. Iran. Med.* 2015. Vol. 18, N 1. P. 44–50.

8. Grunow R., Jacob D., Klee S. et al. Brucellosis in a refugee who migrated from Syria to Germany and lessons learnt // *Euro Surveill.* 2016. Vol. 21, N 31. P. 1–4.

9. Lasch P., Wahab T., Weil S. et al. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: results of an interlaboratory ring trial // *J. Clin. Microbiol.* 2015. Vol. 53, N 8. P. 2632–2640.

10. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology // *J. Microbiol. Methods.* 2017. Vol. 138. P. 20–29.

11. Nyvang H.G., Kvistholm J.A., Bocher S., Damkjaer B.M. et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and Brucella species identified in less than half an hour // *Scand. J. Infect. Dis.* 2010. Vol. 42, N 9. P. 716–718.

12. Clark A., Kaleta E. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology // *Clin. Microbiol. Rev.* 2013. Vol. 26, N 3. P. 547–603.

13. Ferreira L., Castano S.V., Sanchez-Juanes F. et al. Identification of Brucella by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures // *PLoS One.* 2010. Vol. 5, N 12. Article ID e14235.

14. Ломинадзе Г.Г., Семенова Е.А., Мотузова О.В., Калакучкая А.Н. и др. Использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускорения идентификации микроорганизмов в гемокультурах пациентов с подозрением на сепсис // *Лаборатория ЛПУ.* 2014. Спецвыпуск № 4. С. 17–20.

15. Vitr M.A., Mambres D.H., Deghelt M. et al. Brucella melitensis invades murine erythrocytes during infection // *Infect. Immun.* 2014. Vol. 82, N 9. P. 3927–3938.

16. Sedo O., Sedlacek I., Zdrahal Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria // *Mass Spectrom. Rev.* 2011. Vol. 30, N 3. P. 417–434.

17. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Бобрышева О.В., Лямкин Г.И. и др. Разработка алгоритма и дентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии // *Пробл. особо опасных инфекций.* 2015. № 4. С. 96–99.

18. Karger A., Melzer F., Timke M., Bettin B. et al. Interlaboratory comparison of intact-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry results for identification and differentiation of Brucella spp // *J. Clin. Microbiol.* 2013. Vol. 51, N 9. P. 3123–3126.

19. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): санитарные правила СП 1.3.3118-13. М., 2013. 193 с.

20. Lista F., Reubsæet F., De Santis R., Parchen R. et al. Reliable identification at the species level of Brucella isolates with MALDI-TOF-MS // *BMC Microbiol.* 2011. Vol. 11. P. 267.

REFERENCES

1. Lyamkin G.I., Ponomarenko D.G., Khudoleev A.A., Vilinskaya S.V., Zaytsev A.A., Kulichenko A.N. The epidemiological situation of brucellosis the Russian Federation and the member states of the Commonwealth of Independent States *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]. 2016; (1): 68–74. (in Russian)

2. Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Epizootiological-Epidemiological Situation on Brucellosis in the Russian Federation in 2016 and Prognosis for 2017 *Problemy osobo opasnykh infektsiy* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; (2): 23–7. (in Russian)

3. Guidelines for organizing and conducting laboratory diagnosis of brucellosis for laboratories at the territorial, regional, and federal levels: МУК 4.2.3010-12. Moscow, 2012: 65 p. (in Russian)

4. Dixon P., et al. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34 (5): 863–76.

5. Kazemi S., Borzoueisileh S., Ebrahimpour S. Evaluation of brucellosis in patients and diagnostic tests. *Online J Anim Feed Res.* 2015; 4 (3): 60–6.

6. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* 2015; 61 (1): 100–11.

7. Zamanian M., Hashemi Tabar G.R., Rad M., et al. Evaluation of different primers for detection of Brucella in human and animal serum samples by using PCR method. *Arch Iran Med.* 2015; 18 (1): 44–50.

8. Grunow R., Jacob D., Klee S., et al. Brucellosis in a refugee who migrated from Syria to Germany and lessons learnt. *Euro Surveill.* 2016; 21 (31): 1–4.

9. Lasch P., Wahab T., Weil S., et al. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: results of an interlaboratory ring trial. *J Clin Microbiol.* 2015; 53 (8): 2632–40.

10. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods.* 2017; 138: 20–9.

11. Nyvang H.G., Kvistholm J.A., Bocher S., Damkjaer B.M., et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and Brucella species identified in less than half an hour. *Scand J Infect Dis.* 2010; 42 (9): 716–8.

12. Clark A., Kaleta E., et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26 (3): 547–603.

13. Ferreira L., Castano S.V., Sanchez-Juanes F., et al. Identification of Brucella by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. *PLoS One.* 2010; 5 (12) e14235.

14. Lominadze G.G., Semenova E.A., Motuzova O.V., Kalakuckaya A.N., et al. Using the MALDI-TOF method of mass spectrometry to accelerate the identification of microorganisms in blood cultures of patients with suspected sepsis. *Laboratoriya LPU* [Laboratory of Health Care Facilities]. 2014; (4): 17–20. (in Russian)

15. Vitr M.A., Mambres D.H., Deghelt M., et al. Brucella melitensis invades murine erythrocytes during infection. *Infect Immun.* 2014; 82 (9): 3927–38.

16. Sedo O., Sedlacek I., Zdrahal Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass Spectrom Rev.* 2011; 30 (3): 417–34.

17. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Бобрышева О.В., Лямкин Г.И., et al. Development of Algorithm for Identification of Brucellosis Agent Cultures Using MALDI-TOF Mass-Spectrometry. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2015; (4): 96–9. (in Russian)

18. Karger A., Melzer F., Timke M., Bettin B., et al. Interlaboratory comparison of intact-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry results for identification and differentiation of Brucella spp. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (9): 3123–6.

19. Safety of work with microorganisms of the I–II pathogenicity (hazard) groups: sanitary rules SP 1.3.3118-13. Moscow, 2013: 193 p. (in Russian)

20. Lista F., Reubsæet F., De Santis R., Parchen R., et al. Reliable identification at the species level of Brucella isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 267.