

- Tatarūnas V., Lesauskaitė V., Veikutienė A., Jakuška P., Benetis R. The influence of CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms on optimal warfarin doses after heart valve replacement. *Medicina* (Kaunas). 2011; 47(1): 25–30.
- Gaikovitch E.A., Cascorbi I., Mrozikiewicz P.M., Brockmöller J., Frötschl R., Köpke K. et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2003; 59(4): 303–12.
- Sullivan-Klose T.H., Ghanayem B.I., Bell D.A., Zhang Z.Y., Kaminisky L.S., Shenfield G.M. et al. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics*. 1996; 6(4): 341–9.
- Chubaryan V.T. Clinical-pharmacological approaches to individual dosing of isoniazid and rifampicin in patients with pulmonary tuberculosis [*Clinico-pharmacologicheskij podchod k individualnomu dozirovaniyu isoniazida i rifampicina u bolnyh tuberculosom legkih*]. Dis. Rostov-na-Donu; 1994 (in Russian).
- Shenderova R. I. *Opredeleeniye aktivnogo tubazida v sivorotke krovi methodom Villenberga* [Detection of active tubazid in blood serum by Villenberg method]. *Laboratornoe delo*. 1975; 2: 114–6 (in Russian).
- COMPENDIUM 2012 – medical agents [Electronic resource]: handbook / editors – V.N.Kovalenko, A.P.Victorov Online address: <http://compendium.com.ua/akt/82/2826/rifampicinum> (in Russian).

Received 05.10.13

## POLYMORPHISM OF THE BIOTRANSFORMATION GENE – CYTOCHROME-450 2C9 IN THE PATIENTS WITH TUBERCULOSIS

Antonenko P. B., Kresyun V. I.

Odessa National Medical University, Ministry of Healthcare of Ukraine, Odessa, Ukraine

The goal of this work was to study cytochrome-450 (CYP) 2C9 (CYP2C9) gene polymorphism in patients with tuberculosis (TB) and its meaning for development, progress, and outcome of TB, for the pharmacokinetics of the antituberculosis antibiotic rifampicin on the basis of the southern region of Ukraine.

Among the TB patients it was 24.9% less than in carriers of the genotype \*1/\*1 and than in healthy donors. At the same time, it was 25.0% less than in carriers of the genotypes \*1/\*2, \*1/\*3. In the TB patients with the genotype \*2/\*3, \*3/\*3 the level of rifampicin in blood was the lowest. At the beginning of the treatment in carriers of genotype \*1/\*1 the pulmonary destruction was observed 2.5 times more often than in \*1/\*2, \*1/\*3 genotype. According to the cultural method, the carriers of \*1/\*1 more frequently became smear-negative than the carriers of \*1/\*2, \*1/\*3 genotype.

Key words: *CYP2C9 gene; polymorphism; tuberculosis; rifampicin.*

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014  
УДК 579.843.1.083.18^535.243.08

**Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Басов Е.А., Остяк А.С., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В.**

## MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *VIBRIO*

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск

Цель настоящей работы – разработка методологических подходов идентификации представителей рода *Vibrio* с использованием технологии MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа. В работе изучены аспекты биологической безопасности пробоподготовки для масс-спектрометрического анализа, получены референсные спектры шести типовых штаммов *V. cholerae*. С использованием базы MALDI Biotyper 3.0, включающей референсные спектры *V. cholerae*, проведена идентификация 55 штаммов – представителей рода *Vibrio*, в том числе 45 штаммов *V. cholerae* разной эпидемической значимости. Продемонстрирована возможность достоверного определения таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов до видового уровня, при этом результаты полностью соответствуют данным классической микробиологической идентификации. Экспериментально показана стабильность и воспроизводимость предлагаемого метода исследования.

Полученные результаты дают основание рассматривать методику идентификации представителей рода *Vibrio* с использованием технологии масс-спектрометрического анализа как достаточно эффективную, позволяющую в кратчайшие сроки определять видовую принадлежность основных представителей рода *Vibrio*.

Ключевые слова: род *Vibrio*; MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ; идентификация.

Род *Vibrio* насчитывает более 50 видов, часть из которых играет значительную роль в инфекционной патологии человека [1]. Наибольшее клиническое и эпидемическое значение среди представителей рода *Vibrio* имеет *Vibrio cholerae* – возбудитель холеры, особо опасной острой кишечной инфекции, сопровождающейся дегидратацией организма больного.

В мире с начала седьмой пандемии официально зарегистрировано более 7 млн случаев холеры. При этом в последние годы отмечается рост заболеваемости, в том числе и за счет вовлечения в эпидемический процесс стран Американского континента (р. Гаити, Доминиканская Республика, Куба) [2, 3], что свидетельствует о существовании реальной угрозы заноса возбудителя из неблагоприятных по холере стран на новые территории с последующим развитием эпидемических осложнений.

К числу других клинически значимых представителей рода *Vibrio* относятся галофильные вибрионы, в том числе *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, вызывающие острые кишечные инфекции, а также инфекции внекишечной локализации (раневые инфекции, поражения ЛОР-органов, септицемия) [1, 4, 5].

Традиционная микробиологическая идентификация микроорганизмов рода *Vibrio*, основывающаяся на фенотипических тестах (культурально-морфологические, тинкториальные, биохимические свойства, агглютинация со специфическими сыворотками), требует от 36 до 42 ч с момента поступления первичного материала [6, 7]. Молекулярно-генетические методы детекции возбудителя позволяют ускорить процесс, сократив его до нескольких часов [6].

В последние годы в молекулярной диагностике инфекционных заболеваний для экспресс-идентификации

и типирования микроорганизмов применяется новый метод – прямое белковое профилирование с использованием MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight) масс-спектрометрии. Получаемые в процессе анализа видоспецифичные белковые паттерны сравниваются с базой данных и на основании этого определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма [8, 9]. Метод отличается высокой скоростью и простотой выполнения, низкой стоимостью расходных материалов, высокой диагностической чувствительностью и специфичностью, что делает этот подход весьма перспективным для скрининговых исследований большого объема клинического материала и/или объектов окружающей среды. Вместе с тем для некоторых микроорганизмов, в частности для возбудителя холеры, данный метод разработан недостаточно полно. В ряде недавних работ показана эффективность MALDI-ToF MS-идентификации и межвидовой дифференциации микроорганизмов рода *Vibrio* [10, 11]. Однако подавляющее большинство исследованных в этих работах штаммов были выделены из объектов окружающей среды, а не из клинического материала, что затрудняет объективную оценку метода для клинической лабораторной диагностики холеры. Еще одним серьезным ограничением более широкого применения масс-спектрометрической идентификации в клинико-лабораторной диагностике микроорганизмов рода *Vibrio* является отсутствие референсных спектров возбудителя холеры в базе программы MALDI Biotyper 3.0, поставляемой производителем на территорию Российской Федерации.

В соответствии с изложенным целью настоящего исследования – разработка методологических подходов идентификации на основе MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа представителей рода *Vibrio*, в частности возбудителя холеры, выделенных как из объектов окружающей среды, так и из клинического материала.

## Материалы и методы

### Бактериальные штаммы

В работе использовали 55 штаммов рода *Vibrio*, выделенных от больных, из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации и за рубежом с 1957 по 2012 г.

Группа штаммов *V. cholerae* ( $n = 45$ ) включала 27 штаммов O1-серогруппы, 5 штаммов O139-серогруппы, 2 штамма RO и 11 – не O1/O139. Относятся к биовару эльтор 24 штамма *V. cholerae* O1, к классическому биовару – 3. Среди *V. cholerae* O1-серогруппы 18 штаммов охарактеризованы как эпидемически опасные (содержат гены холерного токсина *ctxAB*), в том числе *V. cholerae* O1 классического биовара – 3 штамма, *V. cholerae* O1 биовара эльтор – 15 штаммов. По структуре детерминант патогенности эпидемически опасные изоляты *V. cholerae* эльтор дифференцируются на 3 группы: *ctxB1rstR<sup>EL+</sup>rstR<sup>CL+</sup>* ( $n=12$ ), *ctxB1rstR<sup>EL+</sup>rstR<sup>CL-</sup>* ( $n = 1$ ) и *ctxB3rstR<sup>EL+</sup>rstR<sup>CL-</sup>* ( $n = 2$ ). *V. cholerae cholerae* характеризуются однородностью указанных признаков (содержат специфические для классического биовара аллели генов – *ctxB1* и *rstR<sup>CL</sup>*). Из группы штаммов *V. cholerae* O139 к эпидемически опасным относятся 2 с генотипом *ctxB3rstR<sup>EL+</sup>rstR<sup>CL-</sup>*.

Остальные включенные в выборку штаммы *V. cholerae* O1-серогруппы ( $n=9$ ), O139-серогруппы ( $n = 3$ ), RO-варианта ( $n=2$ ), не O1/O139-серогрупп ( $n=11$ ) не содержат генов основных факторов патогенности холерного вибриона и относятся к эпидемически неопасным.

Из других представителей рода *Vibrio* в исследование были включены штаммы *V. alginolyticus* ( $n = 2$ ), *V. parahaemolyticus* ( $n=3$ ), *V. metschnikovii* ( $n=1$ ), *V. vulnificus* ( $n=1$ ), *V. fluvialis* ( $n = 3$ ). В качестве представителей близкородственной таксономической группы исследовали 4 штамма *Aeromonas spp.*

Таксономическую принадлежность взятых в исследование штаммов определяли при их изоляции на основании стандартных бактериологических тестов, включающих изучение тинкториальных, культурально-морфологических, биохимических, серологических и ряда других свойств.

Дополнительную идентификацию микроорганизмов по комплексу биохимических характеристик проводили с применением «Набора для идентификации *Enterobacteriaceae* и других неприхотливых грамотрицательных палочек API 20E» (API 20E) («BioMérieux», Франция). Для интерпретации результатов использовали базу данных API 20E v 4.1, содержащую информацию о 102 таксонах.

### MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ

Для масс-спектрометрического исследования использовали 18-часовые культуры, выращенные при 37°C на казеиново-дрожжевом агаре (pH 7,6). *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* и *V. vulnificus* культивировали на питательных средах с добавлением 3% раствора NaCl.

Подготовку материала для масс-спектрометрического анализа с учетом требований биологической безопасности и целей его проведения осуществляли двумя способами. Первый способ – прямое нанесение исследуемой культуры в виде мазка на MSP-чип (MSP 96, «Bruker Daltonics», Германия) с последующим наслаиванием на образец 1 мкл насыщенного раствора матрицы ( $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота в 50% растворе ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). Данный способ использовали при исследовании микроорганизмов III-IV групп патогенности. Второй способ – предварительная экстракция белка, при которой происходит одновременное обеззараживание исследуемого материала – применяли при исследовании токсигенных штаммов *V. cholerae*, а также для получения белковых профилей штаммов для создания библиотек референсных спектров. Процедура экстракции белка заключалась в последовательной обработке микробной взвеси этиловым спиртом, 70% муравьиной кислотой с последующим добавлением ацетонитрила [12]. По окончании экстракции по 1 мкл супернатанта анализируемых образцов переносили в лунки MSP-чипа, образцы подсушивали на воздухе, сверху наносили 1 мкл матрицы.

В качестве калибровочного стандарта и положительного контроля анализа использовали белковый экстракт штамма *E. coli* DH5a (ref. № 255343; «Bruker Daltonics», Германия).

Спектры собирали в автоматическом режиме на масс-спектрометре Microflex™ LT MALDI-TOF («Bruker Daltonics», Германия) с использованием программы Flex Control (v. 3.3, build 108), при функционировании прибора в линейном позитивном режиме со следующими параметрами: напряжение Ion Source 1 (IS1) 20 кВ, Ion Source 2 (IS2) 18,05 кВ, напряжение на фокусирующей линзе 6кВ, частота азотного лазера 60 Гц. Параметры работы прибора оптимизировали для диапазона отношения массы иона к его заряду ( $m/z$ ) от 2000 до 20 000. Каждый спектр получали путем суммирования 6 одиночных спектров (240 импульсов лазера).

Для получения референсных библиотек спектров образец исследовали в 12 повторах, для идентификации – в 3 (в случае прямого нанесения) и 5 (при проведении экстракции) повторах.

Анализ спектров, генерацию референсных библиотек и идентификацию выполняли с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 («Bruker Daltonics», Германия). Заключение о таксономической принадлежности микроорганизма осуществляли на основании значения индекса совпадения (параметр score value – SV). Значение  $SV \geq 2,3$  соответствовало достоверной идентификации до вида; SV менее 2,299, но более 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 менее 1,7 – недостоверный результат.

### Проверка белковых экстрактов для масс-спектрометрического анализа на специфическую стерильность

Проверке на специфическую стерильность подвергали полученные по описанному выше протоколу белковые экстракты трех штаммов холерного вибриона: один токсигенный и один нетоксигенный штаммы *V. cholerae* эльтор O1-серогруппы и один штамм *V. cholerae* не O1/O139. Для каждого штамма осуществляли приготовление 4 серий белковых препаратов. Полученные

экстракты, а также смывы с поверхности MSP-чипа с нанесенным на него экстрактом и матрицей, исследовали на наличие *V. cholerae* в соответствии с «Инструкцией по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерного микробов» [13].

#### Биоинформационный и статистический анализ данных

Для учета результатов исследования, формирования промежуточных таблиц, осуществления элементарных расчетов использовали программные ресурсы пакета Microsoft Office Excel 2003. Для оценки достоверности различий значений SV для штаммов, подготовленных для исследования разными методами, применяли критерий Вилкоксона. Кластерный анализ осуществляли с использованием функции Principal Component Analysis программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0, а так-

же методом ближайших соседей (Neighbor-Joining – NJ) при помощи программного комплекса Bionumerics v. 6.01 («Applied Maths», Бельгия).

#### Результаты и обсуждение

Масс-спектрометр представляет собой сложный аналитический инструмент, эксплуатационные характеристики которого не предусматривают возможности проведения пользователем деконтаминации и дезинфекции внутренних рабочих поверхностей и пространств. Поэтому одними из первых задач настоящей работы являлись выбор и оценка обеззара-

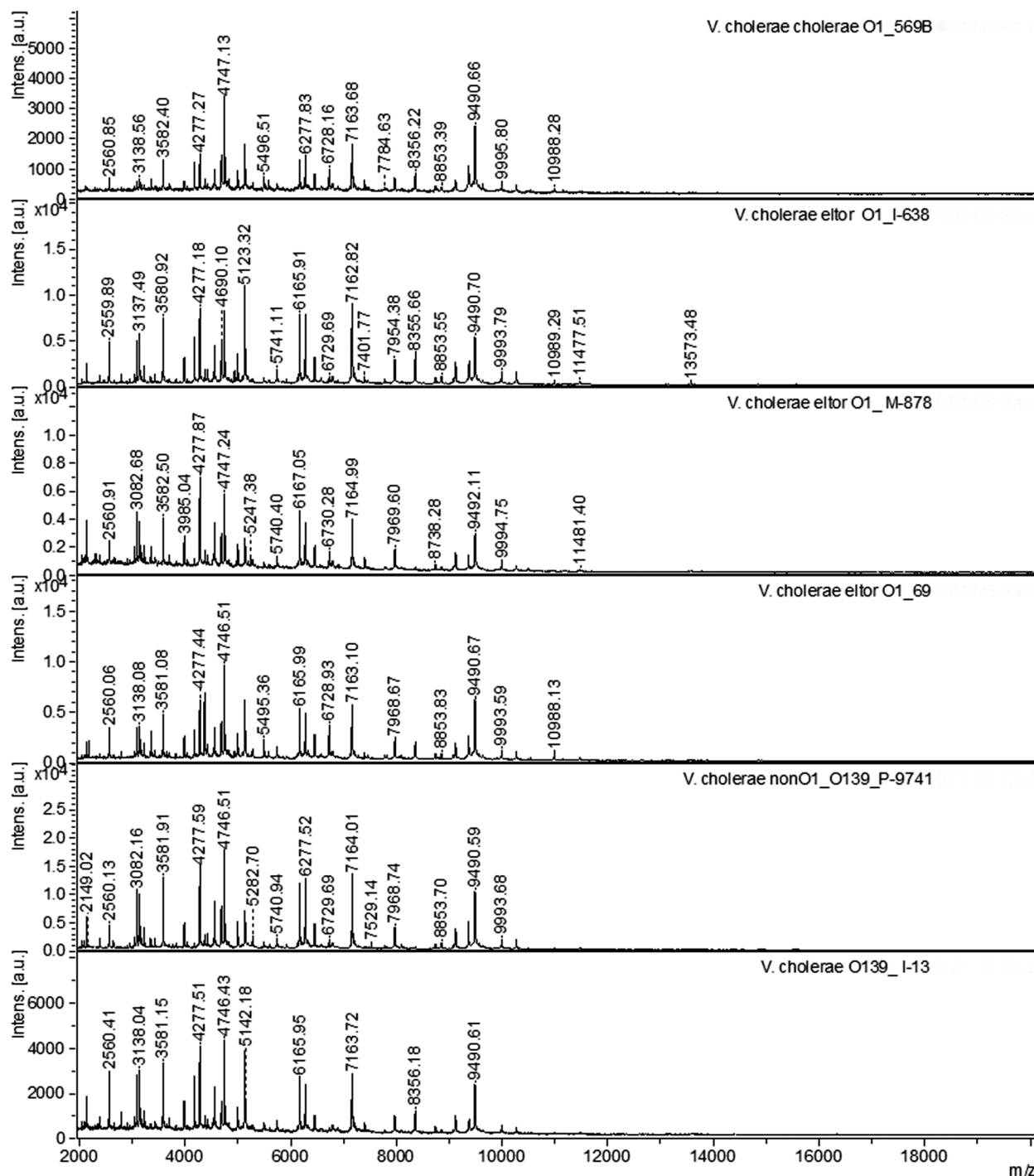


Рис. 1. Референсные спектры штаммов *V. cholerae*.

Сравнительные результаты идентификации исследованных штаммов масс-спектрометрическим и биохимическим методом (тест-система API 20E)

Исходная таксономическая характеристика штаммов по микробиологическим тестам	Результаты масс-спектрометрического анализа			Результаты идентификации в системе API 20E		
	число исследованных штаммов	основной таксон	идентификация	число исследованных штаммов	основной таксон	идентификация
<i>V. cholerae</i> O1	10	<i>V. cholerae</i>	Достоверная до вида	10	<i>V. cholerae</i>	Предположительная
<i>V. cholerae</i> O139	2	<i>V. cholerae</i>	То же	2	<i>V. cholerae</i>	То же
<i>V. cholerae</i> не O1/O139	7	<i>V. cholerae</i>	" "	4	<i>V. cholerae</i>	" "
<i>V. alginolyticus</i>	2	<i>V. alginolyticus</i>	" "	3	<i>V. cholerae</i>	Сомнительная
				1	<i>V. alginolyticus</i>	Хорошая
<i>V. parahaemolyticus</i>	3	<i>V. parahaemolyticus</i>	" "	1	<i>V. alginolyticus</i>	Сомнительная
				3	<i>V. parahaemolyticus</i>	" "
<i>V. metschnikovii</i>	1	<i>V. metschnikovii</i>	Вероятная до рода	1	<i>Aeromonas</i> sp.	Неприемлемый
<i>V. vulnificus</i>	1	<i>V. vulnificus</i>	Достоверная до рода, вероятная до вида	1	<i>V. vulnificus</i>	Сомнительная
<i>V. fluvialis</i>	3	<i>V. fluvialis</i>	Достоверная до вида	1	<i>V. fluvialis</i>	Низкая дискриминация
				1	<i>A. hydrophila/caviae/sorbia</i>	
				1	<i>V. fluvialis</i>	
				1	<i>A. hydrophila/caviae/sorbia</i>	Сомнительная
				1	<i>V. fluvialis</i>	
<i>Aeromonas</i> sp.	4	<i>Aeromonas caviae</i>	То же	1	<i>A. hydrophila</i>	Низкая дискриминация
				1	<i>V. fluvialis</i>	
				1	<i>A. hydrophila/caviae/sorbia</i>	
				1	<i>V. fluvialis</i>	
				1	<i>A. hydrophila/caviae/sorbia</i>	Сомнительная

живающей способности метода пробоподготовки токсигенных штаммов *V. cholerae*, относящихся ко II группе патогенности.

Ранее было показано, что метод подготовки проб для масс-спектрометрии посредством спиртовой обработки с последующей экстракцией муравьиной кислотой и ацетонитрилом оказывает обеззараживающее действие на многие виды патогенных микроорганизмов, обеспечивает максимальное качество получаемых спектров и позволяет сохранять образцы для проведения повторных или отсроченных исследований [14].

Проведенные экспериментальные исследования по оценке специфической стерильности белковых препаратов *V. cholerae*, полученных с использованием указанного метода, подтвердили его эффективную обеззараживающую способность. Отсутствие роста холерного вибриона при посеве белковых экстрактов из трех штаммов *V. cholerae*, а также смывов с поверхности MS-чипа позволило дальнейшие исследования осуществлять в соответствии с требованиями, предъявляемыми к обеззараженному материалу [15].

Для получения референсных спектров *V. cholerae* использовали белковые экстракты 5 типичных штаммов O1 (классического и эльтор биоваров) и O139 се-

рогрупп разной эпидемической значимости, а также одного штамма *V. cholerae* не O1/O139. Штаммы и соответствующие им масс-спектрометрические профили представлены на рис.1. Каждый референсный спектр представлял собой сумму 72 одиночных спектров, отвечающих следующим качественным критериям: алгоритм идентификации пика – Centroid, соотношение сигнал/шум для каждого пика спектра – не менее 2, количество качественных пиков – до 300, минимальная интенсивность пика – не менее 100 отн. ед., ширина пика 4 m/z. Полученные таким образом референсные спектры импортировали в базу данных программы Biotyper MALDI Biotyper 3.0 (build 25), которую использовали для дальнейшей работы по идентификации.

На первом этапе выполняли исследование нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, а также других представителей рода *Vibrio* и *Aeromonas*, относящихся к III-IV группам патогенности (всего 39 штаммов) с использованием метода прямого нанесения. Результаты идентификации соответствовали данным классического бактериологического анализа. Для подавляющего большинства штаммов полученное значение SV составило 2,3 и более, что позволяет с высокой

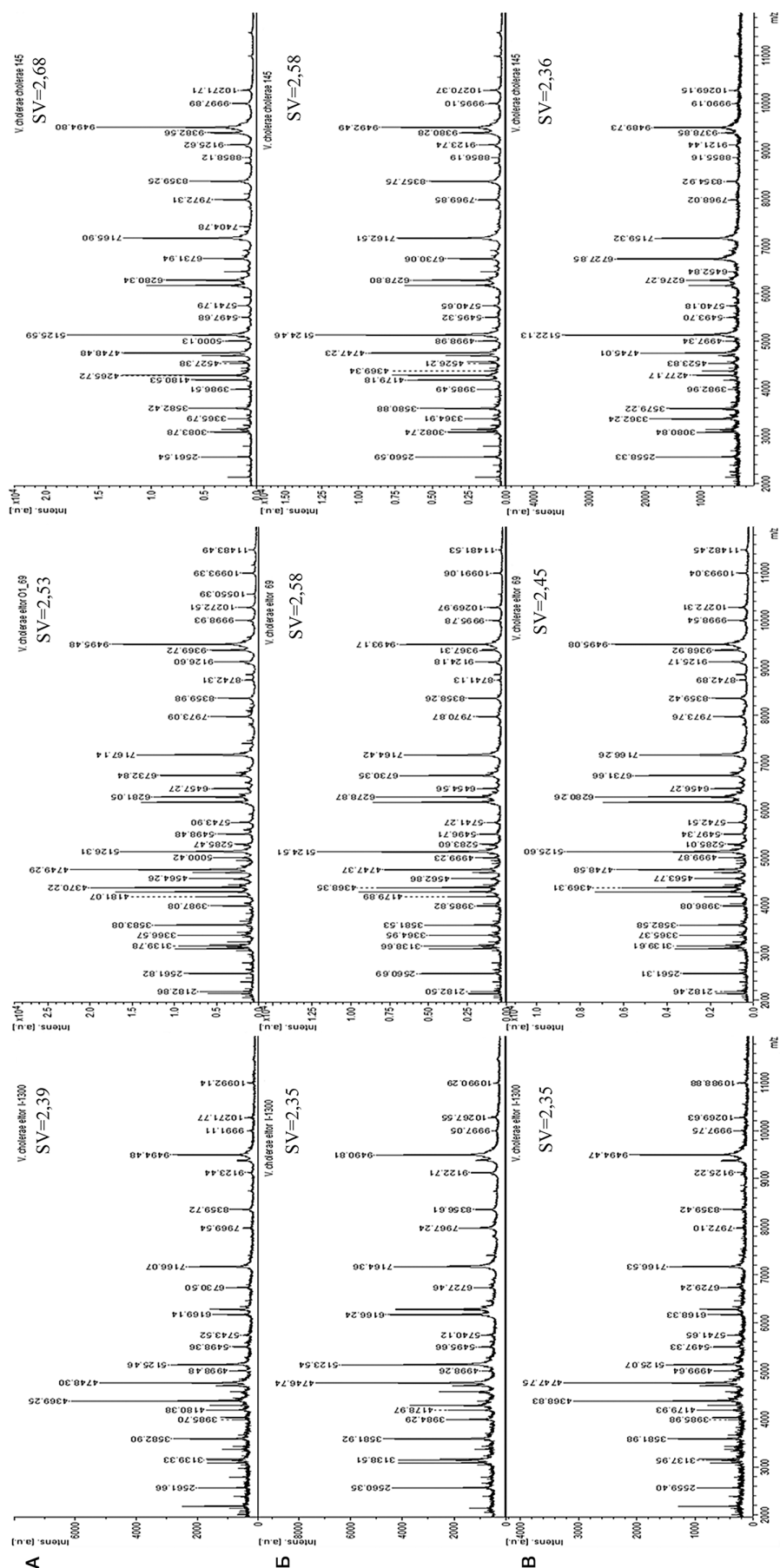


Рис. 2. Спектры штаммов *V. cholerae*, полученные с интервалом 2 мес (линия А- июль 2012 г., линия Б – сентябрь 2012 г., линия В – ноябрь 2012 г.).

вероятностью относить исследуемый микроорганизм к определенному виду. Меньшие значения SV зарегистрированы для штамма *V. cholerae* не O1/O139 1-10 и *V. metschnikovii* 5 (1,976, 1,955 и 1,948 соответственно).

На втором этапе исследовали токсигенные и нетоксигенные штаммы *V. cholerae* ( $n=32$ ) разных серогрупп, предварительную пробоподготовку которых осуществляли методом белковой экстракции. В процессе идентификации все штаммы отнесены к виду *V. cholerae* (зарегистрированы значения SV 2,3 и более).

Для дополнительной проверки и сравнительной оценки эффективности результатов масс-спектрометрического анализа проводили выборочное исследование некоторых штаммов с использованием системы биохимической идентификации API 20E.

Из 19 отнесенных масс-спектрометрическим методом к *V. cholerae* штаммов 16 были идентифицированы системой API 20E как *V. cholerae* на уровне предположительной идентификации, с идентичностью (% ид.) с представителем данного вида 99,9%. Для 3 штаммов *V. cholerae* не O1/O139-серогруппы зарегистрирован сомнительный профиль идентификации (99,6% ид.).

Результаты биохимической идентификации с использованием системы API 20E для других представителей рода *Vibrio* ( $n=10$ ) оказались более переменными: идентичность профилей штаммов *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* с существующими в базе составляла от 90,8 до 99,6%. Провести при помощи системы API 20E идентификацию *V. metschnikovii* не удалось – профиль идентификации неприемлемый. Также при использовании этого метода оказались затруднены идентификация штаммов *V. fluvialis* и их дифференциация с представителями рода *Aeromonas*. Сравнительные результаты идентификации разными методами представлены в таблице.

Во всех случаях результаты масс-спектрометрического анализа полностью соответствовали данным классической микробиологической идентификации. Высокие значения SV позволяли

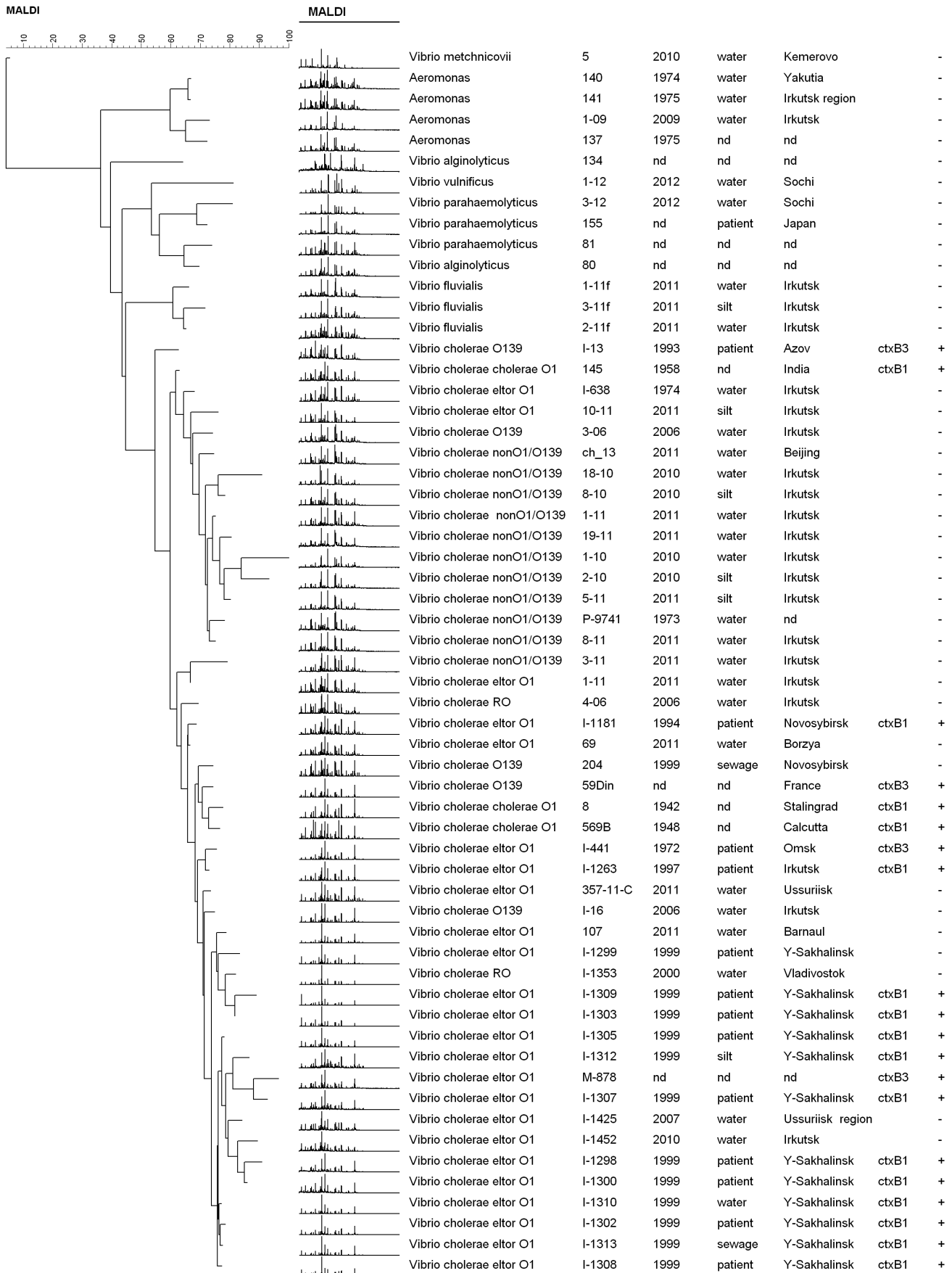


Рис. 3. Дендрограмма, построенная по алгоритму Neighbor-Joining на основании сравнения масс-спектрометрических профилей исследованных штаммов (указан идентификационный номер штамма, год, источник и место выделения. ctxB1/ctxB3 – тип холерного токсина, +/- – наличие/отсутствие *ctxAB*, nd – характеристика неизвестна).

достоверно определять таксономическую принадлежность исследуемых микроорганизмов до видового уровня. Идентификация же штаммов в системе API 20E в большинстве случаев оказывалась на уровне предположительной или сомнительной, что требовало постановки дополнительных тестов.

При сопоставлении результатов исследования образцов с использованием разных методов пробоподготовки выявлена значимая зависимость SV от метода: среднее значение SV при исследовании одних и тех же штаммов при прямом нанесении составляло 2,316, а при белковой экстракции – 2,456 ( $p=0,012793$ ). Это свидетельствует о том, что метод белковой экстракции более предпочтителен для пробоподготовки. В то же время необходимо отметить, что при любом варианте пробоподготовки удалось выполнить идентификацию и правильно классифицировать микроорганизм. На наш взгляд, прямое нанесение реактивов как наиболее простой и быстрый метод, не требующий дополнительного оборудования, может рассматриваться в качестве метода выбора при масштабных скрининговых микробиологических исследованиях вибриофлоры поверхностных водоемов на этапе идентификации подозрительных на принадлежность к роду *Vibrio* колоний (после их предварительного тестирования в ориентировочной реакции агглютинации с O1 и O139 холерными сыворотками). При этом масс-спектрометрическому анализу посредством прямого нанесения материала следует подвергать не агглютинирующиеся указанными сыворотками колонии. Масс-спектрометрическую идентификацию агглютинирующихся колоний, а также культур, полученных при исследовании клинического материала и материала из объектов окружающей среды в условиях неблагоприятной эпидемической обстановки, следует осуществлять после предварительной белковой экстракции.

Для оценки стабильности и воспроизводимости спектров культуры исследовали трехкратно с интервалом 2 мес. Результаты анализа для некоторых штаммов представлены на рис. 2. Спектры, полученные для одного штамма в течение 6 мес, остаются практически неизменными (повторные исследования позволяют идентифицировать штамм до вида с высоким значением SV).

Нами также была предпринята попытка оценки возможности использования масс-спектрометрического анализа для внутривидовой дифференциации штаммов. Результаты кластерного анализа, выполненного на основе сравнения масс-спектрометрических профилей, представлены в виде дендрограммы на рис. 3.

При этом наблюдалась достаточно четкая дифференциация штаммов, относящихся к разным видам рода *Vibrio*. Все представители вида *V. cholerae* формировали отдельную группу, в которой выделяли несколько подгрупп. Разделение ассоциировали с некоторыми фенотипическими и эпидемиологическими особенностями исследованных штаммов. Так, отдельный кластер формировался штаммами не O1/O139-серогрупп, выделенными из воды поверхностных водоемов и ила. Штаммы, изолированные на вспышке холеры в г. Южно-Сахалинске в 1999 г., также составляли обособленную группу. В то же время закономерностей распределения штаммов в зависимости от их биовара, токсигенных свойств, особенностей струк-

туры детерминант вирулентности не наблюдалось.

Результаты проведенного исследования позволяют рассматривать методику идентификации представителей рода *Vibrio* с использованием технологии масс-спектрометрического анализа как достаточно эффективную. Относительно высокую стоимость оборудования компенсируют высокая производительность и простота метода, а также низкая стоимость расходных материалов. Возможность использования данного подхода для эпидемиологического типирования требует дополнительного изучения и иных алгоритмов анализа масс-спектров. В этом направлении перспективными представляются исследования по сравнению результатов масс-спектрометрического типирования и традиционных методов молекулярно-генетического анализа (мультилокусное сиквенстипирование, анализ числа вариабельных тандемных повторов, пульс-электрофорез), необходимые для уточнения возможностей метода и определения его места в лабораторной диагностике инфекций, вызываемых микроорганизмами рода *Vibrio*.

#### Сведения об авторах:

##### ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Афанасьев Максим Владимирович – вед. науч. сотр. отдела эпидемиологии, канд.биол.наук. 664047 Иркутск; ул. Триллсера, 78; e-mail: afanasev\_max@mail.ru

Миронова Лилия Валерьевна – и.о. зав. лабораторией холеры, канд.мед.наук;

Басов Евгений Александрович – мл. науч. сотр. лаборатории холеры;

Остяк Александр Сергеевич – мл. науч. сотр. ОБТК;

Куликалова Елена Станиславовна – ст. науч. сотр. лаборатории холеры, канд.мед.наук;

Урбанович Людмила Яковлевна – ст. науч. сотр. лаборатории холеры, д-р мед.наук;

Балахонов Сергей Владимирович – директор института, д-р мед.наук, проф.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Онищенко Г.Г., Ганин В.С., Голубинский Е.П. Вибрионы не O1 серологической группы и их значение в патологии человека. М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ; 2001.
2. Dieckmann R., Strauch E., Alter T. J. Appl. Microbiol. 2010; 109(1): 199–211.
3. Harris J.B., LaRocque R.C. et al. Lancet. 2010; 376: 1961–65.
4. Weekly Epidemiol. Rec. 2012; 87(31–32): 289–304.
5. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых паразитическими и другими патогенными для человека вибрионами: Методические указания МУК 4.2.1793–03. М.; 2003.
6. Смоликова Л.М., Ломов Ю.М., Хоменко Т.В. и др. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2001; 6: 3–7.
7. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания МУК 4.2.2218–07. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007.
8. Laboratory methods for the diagnosis of epidemic dysentery and cholera. Centres for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia: CDC; 1999.
9. Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. FEMS Microbiol. Rev. 2012; 36(2): 380–407.
10. van Belkum A., Welke M. et al. J. Clin. Microbiol. 2012; 50(5): 1513–7.
11. Dieckmann R., Strauch E., Alter T. J. Appl. Microbiol. 2010; 109(1): 199–211.
12. Eddabra R., Prévost G., Scheffel J.-M. Microb. Res. 2012; 167: 226–30.
13. Marklein G., Josten M., Klanke U. et al. J. Clin. Microbiol. 2009; 47: 2912–7.

14. Инструкции по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного и холерного микробов. Саратов; 1982.
15. Drivenek M., Dresler J., Klimentova J. et al. Lett. Appl. Microbiol. 2010; 109(1): 199–211.
16. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1285-03. М.; 2003.

Поступила 27.03.13

#### MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRIC ANALYSIS IN THE ACCELERATED IDENTIFICATION OF THE VIBRIO GENUS MICROORGANISMS

Afanasev M. V., Mironova L. V., Basov E. A., Ostyak A. S.,  
Kulikalova E. S., Urbanovich L. Ya., Balahonov S. V.

Irkutsk Antiplague Research Institute, Federal Service for  
Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare,  
Irkutsk, Russia

The goal of this work was to develop methodological approaches to identification of the *Vibrio* genus representatives using the MALDI-TOF mass-spectrometric analysis technologies. The aspects of the biological safety in sample preparations for mass-spectrometric analysis were studied, reference spectra of six typical *V. cholerae* strains were developed. Identification of 55 strains, representatives of the *Vibrio* genus, including 45 *V. cholerae* strains with different epidemic importance, was performed using the MALDI Biotyper 3.0 basis comprising *V. cholerae* reference spectra. The possibility of reliable definition of the tested strain taxonomic belonging to the species level was demonstrated. Thus, the results completely corresponded to the data of classical microbiological identification. Stability and reproducibility of the offered research method was experimentally shown.

The results allow identification of the *Vibrio* genus representatives to be implemented with the use of the mass-spectrometric analysis as an effective method that defines a species belonging of the basic *Vibrio* genus representatives in the shortest terms.

**Key words:** *Vibrio* genus; MALDI-TOF mass-spectrometric analysis; identification.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014  
УДК 616.36-002-022:578.891]-078

**Воронина О.Л., Кунда М.С., Гудов В.П., Аксенова Е.И., Шилова В.С., Ярош Л.В., Эльгорт Д.А.,  
Лукин В.Г., Семенов Т.А.**

#### ПОИСК РНК АУТОХТОННОГО ДЛЯ РОССИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА Е В НАИБОЛЕЕ ВЕРОЯТНЫХ ИСТОЧНИКАХ ИНФЕКЦИИ

ФГБУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи  
Минздрава РФ, 123098, Москва, Россия

Исследования, проводившиеся на протяжении 30 лет с момента открытия вируса гепатита Е (ВГЕ), доказали наличие аутохтонного ВГЕ в эндемичных районах – Европе и России в целом. Мониторинг антител к ВГЕ (анти-ВГЕ) у населения РФ выявил регионы с повышенной серопревалентностью, что свидетельствует о высокой вероятности инфицирования ВГЕ лиц, проживающих в этих областях. Особую опасность контакт с ВГЕ может представлять для пациентов из групп риска.

В настоящем исследовании проведено тестирование сывороток крови этих контингентов на наличие анти-ВГЕ. Серопозитивные сыворотки от лиц из регионов с высоким процентом выявления анти-ВГЕ, пациентов из групп риска, образцы с высокой вероятностью содержания ВГЕ, в том числе от животных, являющихся возможным резервуаром ВГЕ, были использованы для выделения РНК. Разработанная система детекции РНК ВГЕ как в ОТ-ПЦР в реальном времени, так и в варианте гнездовой ПЦР, подтвердила свою чувствительность на синтетических контролях и положительных контролях коммерческой тест-системы компании «Genesig» (Великобритания).

Во всех исследованных образцах РНК ВГЕ отсутствовала, что свидетельствует о низкой частоте встречаемости вирусносительства аутохтонного ВГЕ и необходимости расширения выборки до десятков тысяч человек для достоверного выявления РНК вируса.

**Ключевые слова:** вирус гепатита Е; анти-ВГЕ IgG; анти-ВГЕ IgM; РНК ВГЕ.

30 лет назад М.С. Балаян и соавт. идентифицировали вирус гепатита Е (ВГЕ) с помощью иммуноэлектронной микроскопии [1].

Через 20 лет по результатам исследования эндемичных по ВГЕ районов Узбекистана и Киргизии С.Н. Кузиным и соавт. было показано, что в Кашкадарьинской области Узбекистана антитела к ВГЕ были обнаружены у 22,1% пациентов с острым гепатитом Е (ГЕ), включая смешанные инфекции (гепатит А (ГА) или гепатит В (ГВ)). В эндемичных районах антитела к ВГЕ обнаружены у 4% доноров в Сургуте, у 1,6% пациентов с ВИЧ и у 1,1% медицинских работников в Москве [2].

Еще через 10 лет в Нижегородской области среди мигрантов из эндемичных по ВГЕ районов А.В. Поляниной и соавт. анти-ВГЕ IgG выявлены у 31,9±3,7% обследованных. Среди «условно-здорового» населения частота выявления анти-ВГЕ IgG составила 4,4±2,1% [3]. Таким образом, резких изменений в показателях сероконверсии за прошедшие годы не обнаружено.

Гепатит Е отличает фульминантное течение у беременных женщин в эндемичных по ВГЕ районах. Изучение этой группы пациентов в 2000-х годах показало, что частота обнаружения анти-ВГЕ IgG среди беременных женщин, проживающих в Египте, составила 61,4%, а в России – 1,2% [4]. Таким образом, в эндемичных районах (в том числе в России) и в этой группе выявление лиц, контактировавших с ВГЕ, чрезвычайно редко.

Подтверждением фактов завоза вируса ГЕ из эндемичных районов служат ретроспективные исследования заболеваемости ГЕ в 2000–2012 гг. в Санкт-Петербурге (установленные с помощью исследования анти-ВГЕ IgG, IgM в сыворотке больных), показавшие, что и в эти годы ГЕ преимущественно болели мигранты из стран с тропическим и субтропическим климатом и лица, приехавшие на учебу из Индии [5].

Как показали исследования геномов ВГЕ, генотипы 1 и 2 распространены в эндемичных районах: генотип 1 – в странах тропических и субтропических районов Азии и Африки, генотип 2 – в Мексике, Нигерии, Чаде, и циркулируют среди людей [6]. ВГЕ генотипа 3 распространен повсеместно как среди животных, так и среди людей [7]. ВГЕ генотипа 4, ранее признанный эндемичным для Индии [8], в настоящее время обнаружен у свиней в Нидерландах и Бельгии и является причиной гепатита у человека [9].

Заболевания, вызываемые ВГЕ генотипов 3 и 4, по всей видимости, следует отнести к зоонозам. Это предположение высказал М.С. Балаян в 2000 г. [10], и оно находит все больше подтверждений, в том числе и филогенетических. А.М. Purdy и Yu.E. Khudyakov, проанализировав 55 геномов ВГЕ,