

А.Н.Спицын, Д.В.Уткин, Н.Е.Щербакова, С.А.Портенко, А.С.Абдрашитова, И.А.Кас'ян,
В.Г.Германчук, В.Е.Куклев

MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»», Саратов, Российская Федерация

Цель. Продемонстрировать целесообразность создания базы данных референсных масс-спектров возбудителей особо опасных инфекций методом MALDI-TOF масс-спектрометрии на примере штаммов возбудителей чумы. **Материалы и методы.** В работе использовался метод MALDI-TOF масс-спектрометрии для получения масс-спектров рибосомальных белков исследуемых микроорганизмов с помощью масс-спектрометров Microflex LT. **Результаты и выводы.** Проведено сравнение полученных масс-спектров 10 штаммов *Y. pestis* с референсными спектрами *Y. pseudotuberculosis* коммерческой базы данных MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Германия). Произведено апробирование базы данных при проведении идентификации штаммов чумного микроба, выделенных из природных очагов чумы на территории Российской Федерации в 2012 и 2014 гг. Разработанная база данных позволяет осуществлять идентификацию штаммов *Y. pestis* до вида.

Ключевые слова: *Y. pestis*, MALDI-TOF масс-спектрометрия, база данных, идентификация, референсные масс-спектры.

Корреспондирующий автор: Спицын Алексей Николаевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.N.Spitsyn, D.V.Utkin, N.E.Shcherbakova, S.A.Portenko, A.S.Abdrashitova, I.A.Kas'yan, V.G.Germanchuk, V.E.Kuklev

MALDI-TOF Mass-Spectrometry Analysis of Plague Agent Strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Objective of the study was to demonstrate practicability of data base creation, containing reference mass-spectra of agents of particularly dangerous infections, using MALDI-TOF mass-spectrometry, by the example of plague agent strains. **Materials and methods.** MALDI-TOF mass-spectrometry was deployed for the obtainment of mass-spectra of ribosomal proteins from the microorganisms under investigation with the help of mass-spectrometers – Microflex LT. **Results and conclusions.** Carried out was comparative analysis of the obtained mass-spectra of 10 *Y. pestis* strains and reference spectra of *Y. tuberculosis*, contained in commercial data base of MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Germany). Developed data base was validated in the process of identification of plague microbe strains, isolated in the territory of natural plague foci of the Russian Federation. That data base provided for correct identification of *Y. pestis* strains up to a species.

Key words: MALDI-TOF mass-spectrometry, database, identification, reference mass-spectra.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Aleksey N. Spitsyn, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Spitsyn A.N., Utkin D.V., Shcherbakova N.E., Portenko S.A., Abdrashitova A.S., Kas'yan I.A., Germanchuk V.G., Kuklev V.E. MALDI-TOF Mass-Spectrometry Analysis of Plague Agent Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:91–94. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-91-94

В последнее время широкое распространение в идентификации микроорганизмов получил метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Масс-спектрометрия – метод исследования и анализа вещества, основанный на ионизации атомов и молекул, входящих в состав исследуемого образца, и регистрации спектра масс образовавшихся ионов. Полученный спектральный паттерн (белковый профиль) является уникальной родо-, видо-, а в некоторых случаях штаммоспецифичной характеристикой, которая позволяет идентифицировать микроорганизм до рода, вида и иногда осуществить подвидовую дифференциацию.

Высокая точность идентификации микроорганизмов с помощью данного метода, основанного на анализе белкового состава микроорганизмов, была отмечена многими исследователями [3, 4, 5, 6]. Применение метода прямого белкового профили-

рования позволяет сократить время идентификации выделенных культур микроорганизмов (до 2 ч) по сравнению с общепринятыми методиками (6–48 ч), а также снижает стоимость исследований и увеличивает пропускную способность лаборатории [1, 2, 7]. Одним из необходимых условий достоверной видовой дифференциации является наличие достаточной масс-спектрометрической базы данных белковых профилей микроорганизмов.

При идентификации микроорганизмов на MALDI-TOF масс-спектрометрах Microflex в работе используют коммерческие базы данных (MALDI Biotyper 3.1, Bruker Daltonics, Германия). Однако в коммерческой базе данных программы MALDI Biotyper 3.1, поставляемой в Российскую Федерацию, отсутствуют референсные спектры возбудителей опасных инфекционных болезней, в частности, микроорганизмов вида *Yersinia pestis*. Цель данной работы заключалась в дополнении существующей базы данных спектрами

штаммов *Y. pestis* для использования в дальнейшем при идентификации чумного микроба методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Для решения данной проблемы специалистами учреждений Роспотребнадзора ведется работа по созданию библиотек и баз данных спектров штаммов *Y. pestis*.

Материалы и методы

В работе использовали 25 штаммов *Y. pestis*, выделенных в период с 1970 по 2014 год в различных природных очагах чумы, из них 10 штаммов – для создания референсных масс-спектров (таблица) и 15 штаммов – при апробации созданной базы данных в ходе идентификации штаммов чумного микроба. Штаммы *Y. pestis* из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» являются типичными по культурально-морфологическим, биохимическим и молекулярно-генетическим свойствам. Штаммы чумного микроба для получения масс-спектров культивировали на агаре Хоттингера (рН 7,2) при температуре 28 °С в течение 24–48 ч.

Методика масс-спектрометрического анализа

Для создания референсных масс-спектров (MSP) возбудителей особо опасных инфекционных болезней и внесения их в базу данных используют белковые экстракты исследуемых культур микроорганизмов. Белковую экстракцию проводили с использованием 96 % этанола и 70 % водного раствора муравьиной кислоты по стандартной методике, рекомендованной Bruker для проведения MALDI-TOF прямого белкового профилирования неспорообразующих микроорганизмов.

Полученный супернатант (1 мкл), содержащий белковый экстракт, наносили на ячейку 96-луночного MSP-чипа (MSP 96 target polished steel BC, microScout Target). На поверхность супернатанта в чипе наносили 1 мкл раствора матрицы (насыщенный раствор α -Циано-4-гидроксикоричной кислоты (α -HCCA) с 50 % содержанием ацетонитрила и 2,5 % трифторук-

сусной кислоты (TFA)) и высушивали при комнатной температуре.

Чип с нанесенными на него образцами помещали в MALDI-TOF масс-спектрометр microflex LT. После позиционирования чипа в ионизационной камере и достижения необходимых значений рабочих параметров прибора проводили калибровку с помощью нанесенного калибровочного стандарта. После этого приступали к сбору спектров в ручном или автоматическом режиме, устанавливая необходимые параметры. Для получения одиночного масс-спектра использовали 40 импульсов лазера (частота 60 Гц). Анализируемый диапазон масса/заряд составлял 2000–20000 Да.

Для штаммов *Y. pestis* сбор спектров проводили по следующей схеме: с 8 ячеек MSP-чипа (для каждого штамма) были получены 24 исходных масс-спектра. В программе flexAnalysis (Bruker Daltonics) проводилась оценка качества исходных масс-спектров, сглаживание, выравнивание и вычет фоновой линии. Далее в программе «MALDI Biotyper 3.1 (Offline classification)» из отобранных исходных масс-спектров были созданы референсные масс-спектры. Для создания референсного масс-спектра одного штамма необходимо не менее 20 исходных.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного масс-спектрометрического анализа были получены референсные масс-спектры десяти штаммов возбудителя чумы *Y. pestis* (таблица). В ходе проведения эксперимента исследуемые типичные штаммы *Y. pestis* с использованием референсных масс-спектров, содержащихся в базе данных программы MALDI Biotyper 3.1, были идентифицированы как микроорганизмы вида *Y. pseudotuberculosis*. При построении MALDI-TOF дендрограммы масс-спектров в программе Biotyper по алгоритму метода попарного внутригруппового невзвешенного среднего (англ. Unweighted Pair Group

Штаммы *Y. pestis*, используемые для создания референсных масс-спектров

Название штамма	Место выделения	Природный очаг	Дата выделения
<i>Y. pestis ssp. pestis</i> M-1773 [1047 Аст.]	Астраханская область, Красноярский район	Волго-Уральский песчаный	17.05.2002
<i>Y. pestis ssp. pestis</i> M-1864 (883-Аст)	Республика Калмыкия, Лаганский район	Прикаспийский песчаный	16.04.2009
<i>Y. pestis ssp. pestis</i> M-978 [1109 Астр.]	Калмыкская АССР, Юстинский район, Черные земли	Прикаспийский Северо-Западный степной	14.04.1990
<i>Y. pestis ssp. caucasica</i> C-740 [494]	Республика Дагестан, Кулинский район, с. Хозрек	Восточно-Кавказский высокогорный	08.06.1998
<i>Y. pestis ssp. pestis</i> C-627 [176 КБ]	Карачаево-Черкесская Республика, г. Кызыл-Кала	Центрально-Кавказский высокогорный	28.08.1986
<i>Y. pestis ssp. pestis</i> A-1809	Урочище Карагайлы (долина реки Беш-Таш) Таласского хребта Тянь-Шаня	Таласский высокогорный	28.08.1980
<i>Y. pestis</i> A-1815 [257/17]	Таласский район, урочище Карагайлы	Таласский высокогорный	06.09.1980
<i>Y. pestis ssp. ulegeica</i> KM-684 (И-2422)	МНР, Баян-Улэгэйский аймак, г. Цаган-Нур		27.06.1974
<i>Y. pestis ssp. altaica</i> И-2998 [62]	Республика Алтай, Кош-Агачский район, Кызыл-Тас	Горно-Алтайский высокогорный	27.08.1982
<i>Y. pestis ssp. pestis</i> 1116-Д	Малгобекский эпидотряд, 5 км севернее с. Ачалуки	Терско-Сунженский низкогорный	23.06.1970

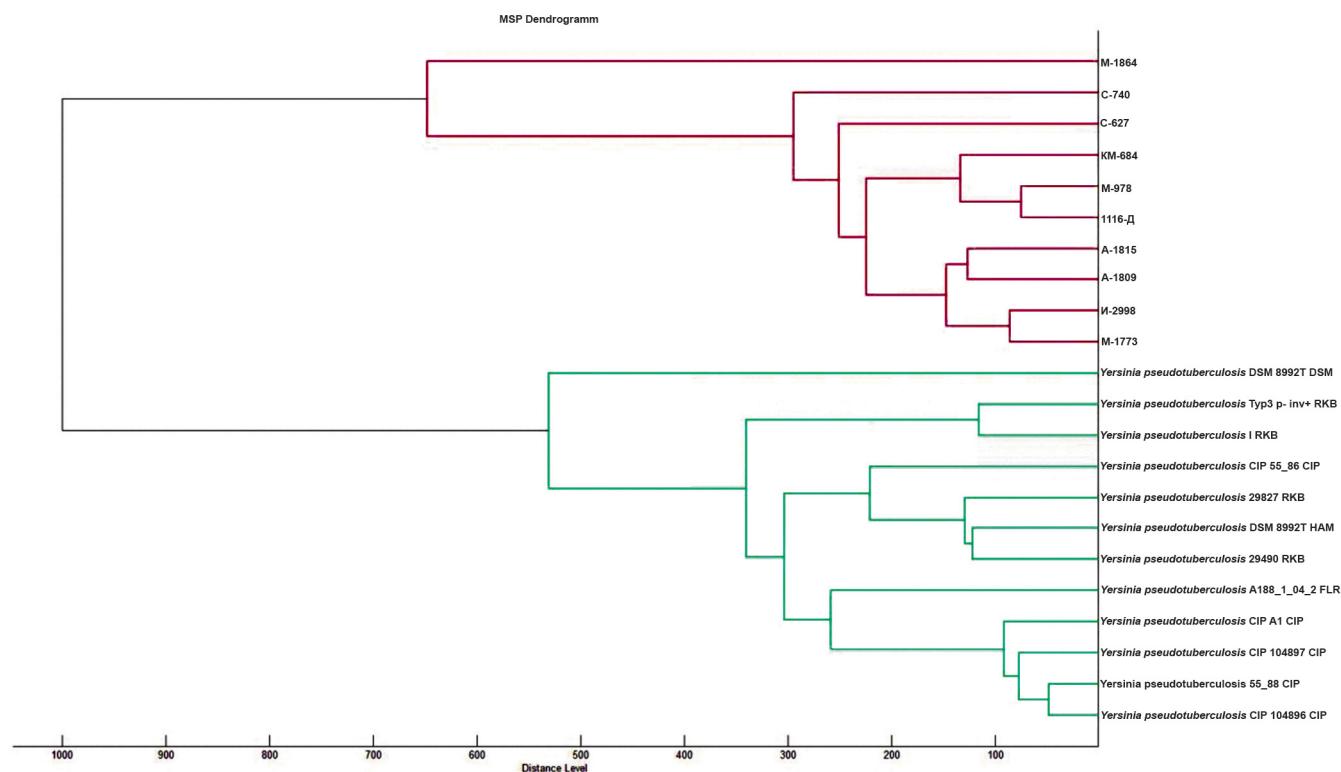


Рис. 1. Кластерный анализ MALDI-TOF-MS спектров штаммов *Y. pseudotuberculosis*, содержащихся в базе данных программы MALDI Biotyper 3.1 и вносимых в базу данных штаммов возбудителя *Y. pestis*. Расстояние отображается в относительных единицах

Method with Arithmetic Mean, UPGMA) было установлено, что исследуемые штаммы микроорганизмов

вида *Y. pestis* и вида *Y. pseudotuberculosis* кластеризуются двумя четко различимыми группами (рис. 1).

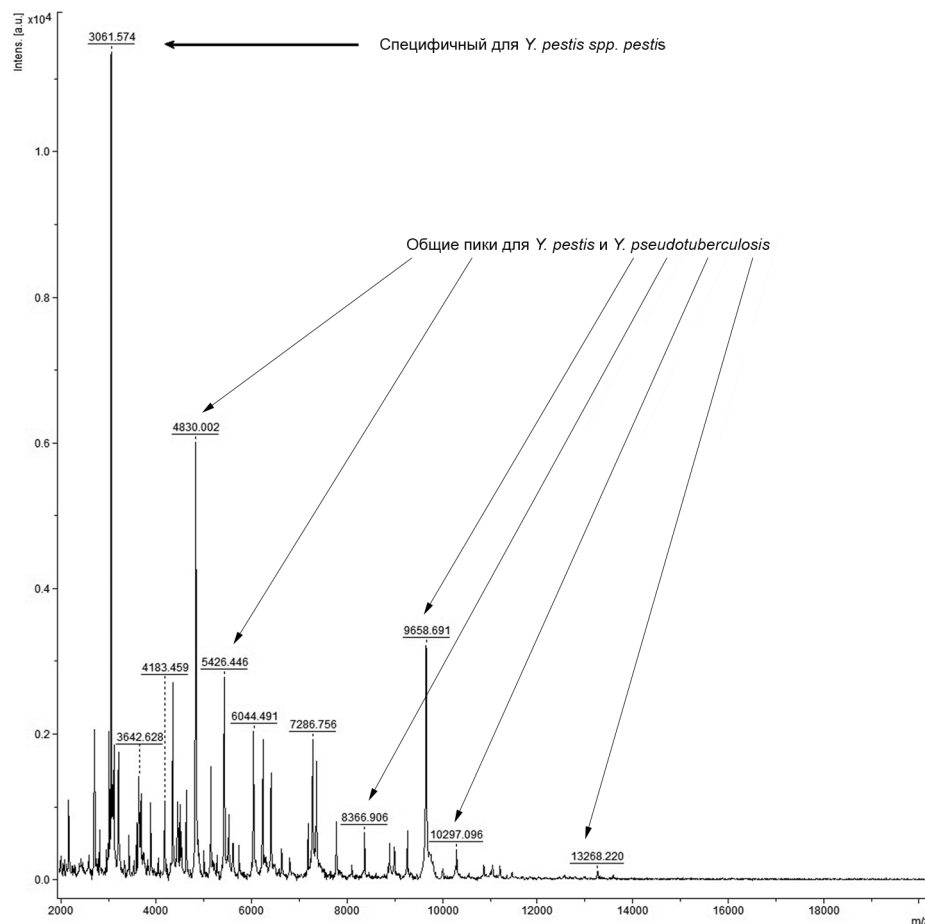


Рис. 2. Пики, специфичные и общие для *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*

Сравнительный анализ полученных масс-спектрометрических профилей *Y. pestis* позволил определить специфичный пик для основного подвида *pestis* (m/z 3061) и общие пики для *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* (m/z 4830, 5426, 8366, 9658, 10297, 13268) (рис. 2).

Следующий этап работы заключался в апробации созданной базы данных масс-спектров при проведении идентификации 15 штаммов возбудителя чумы: *Y. pestis* основного подвида (штамм 1454) и *Y. pestis* алтайского подвида, выделенных на территории Горно-Алтайского природного очага чумы в 2012 и 2014 гг. (штаммы 1307, 2397, 2416, 2513-15, 2633, 2639, 2739, 2774, 2881, 2967, 3021, 2691, 3057, 3067). Во всех случаях культуры были идентифицированы как *Y. pestis* со значением score $\geq 2,3$.

Таким образом, полученные результаты исследования показали возможность создания баз данных возбудителей опасных инфекций, что, в свою очередь, позволяет проведение их идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Спицын А.Н., Уткин Д.В., Куклев В.Е., Портенко С.А., Германчук В.Г., Осина Н.А. Применение MALDI масс-спектрометрии в диагностике инфекционных болезней. Современное состояние и перспективы. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 3:77–82.
2. 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 Microbiology*. 2010; 10:285.
3. Bader O., Weig M., Taverne-Ghadwal L., Lugert R., Cross U., Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17:1359–65. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03398.x.
4. Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P., Schrenzel J. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1169–75. DOI: 10.1128/JCM.01881-09.
5. Croxatto A., Prod'homme G., Greub G. Applications of

MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 36:380–407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.

6. Veen van S.Q., Claas E.C.J., Kuijper Ed. J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(3):900–7. DOI: 10.1128/JCM.02071-09.

7. Wittwer M., Lasch P., Drevinek M., Schmoldt S., Indra A., Jacob D., Grunow R. First Report: Application of MALDI-TOF MS within an External Quality Assurance Exercise for the Discrimination of Highly Pathogenic Bacteria from Contaminant Flora. *Applied Biosafety*. 2012; 17(2):59–63.

References

1. Spitsyn A.N., Utkin D.V., Kuklev V.E., Portenko S.A., Germanchuk V.G., Osina N.A. [Application of MALDI mass-spectrometry for diagnostics of particularly dangerous infectious diseases: current state of affairs and prospects]. *Probl. Osobo. Opasn. Infek.* 2014; 3:77–82.
2. 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 Microbiology*. 2010; 10:285.
3. Bader O., Weig M., Taverne-Ghadwal L., Lugert R., Cross U., Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17:1359–65. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03398.x.
4. Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P., Schrenzel J. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1169–75. DOI: 10.1128/JCM.01881-09.
5. Croxatto A., Prod'homme G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 36:380–407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
6. Veen van S.Q., Claas E.C.J., Kuijper Ed. J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(3):900–7. DOI: 10.1128/JCM.02071-09.
7. Wittwer M., Lasch P., Drevinek M., Schmoldt S., Indra A., Jacob D., Grunow R. First Report: Application of MALDI-TOF MS within an External Quality Assurance Exercise for the Discrimination of Highly Pathogenic Bacteria from Contaminant Flora. *Applied Biosafety*. 2012; 17(2):59–63.

Authors:

Spitsyn A.N., Utkin D.V., Shcherbakova N.E., Portenko S.A., Abdrashitova A.S., Kas'yan I.A., Germanchuk V.G., Kuklev V.E. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Спицын А.Н., Уткин Д.В., Щербакова Н.Е., Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Касьян И.А., Германчук В.Г., Куклев В.Е. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 07.05.15.