

Д.В.Ульшина, Д.А.Ковалев, О.В.Бобрышева, Г.И.Лямкин, А.А.Худолеев, Ю.В.Сирица, А.Н.Куличенко

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ИДЕНТИФИКАЦИИ КУЛЬТУР ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация*

В работе приведены результаты прямого белкового профилирования коллекции штаммов бруцелл с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Стандартизована методика обеззараживания культур возбудителя бруцеллеза и последующего анализа при использовании MALDI-TOF MS. Получены 59 репрезентативных белковых профилей представителей шести основных видов бруцелл (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*), которые включены в электронную базу данных масс-спектров в среде программы Biotyper v 3.0 (Bruker Daltonics, Германия). При анализе масс-спектров исследованных штаммов бруцелл выявлены 17 родоспецифичных фрагментов в диапазоне масс 2000–20000 Да, совокупность которых в MALDI-TOF масс-спектрах может использоваться при идентификации *Brucella spp.* В работе также описаны фрагменты, специфичные для отдельных видов и штаммов бруцелл, представляющие интерес в качестве маркеров для внутривидовой дифференциации возбудителя. На основании полученных данных разработан стандартизированный алгоритм идентификации и дифференциации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, белковое профилирование, возбудитель бруцеллеза.

D.V.Ul'shina, D.A.Kovalev, O.V.Bobrysheva, G.I.Lyamkin, A.A.Khudoleev, Yu.V.Siritsa, A.N.Kulichenko

Development of Algorithm for Identification of Brucellosis Agent Cultures Using MALDI-TOF Mass-Spectrometry*Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation*

Given are the results of direct protein profiling of brucella strain collection using matrix laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS). Standardized is the method for brucellosis agent culture disinfection and subsequent assessment. Obtained are 59 representative protein profiles of six major species (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*), which are included into electronic database of mass-spectra, integrated in Biotyper v 3.0 software (Bruker Daltonics, Germany). Analysis of mass-spectra of brucella strains under investigation revealed 17 genus-specific fragments within the mass range of 2000–20000 Da, the combination of which can be used for *Brucella spp.* identification. In addition, described are the fragments, specific for certain brucella species and strains, promising as markers for intraspecific differentiation. Based on the data received developed is a standardized algorithm of identification and differentiation of brucellosis agent cultures applying MALDI-TOF mass spectrometry.

Key words: mass-spectrometry, protein profiling, brucellosis agent.

Материалы и методы

Штаммы бруцелл, питательные среды, реактивы. В работе использовали 59 культур бруцелл шести видов (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*) из коллекции микроорганизмов Ставропольского противочумного института, в том числе 11 референсных штаммов: *B. abortus* 19 ВА (вакцинный), *B. abortus* 544 (1 биовар, референсный), *B. abortus* 1552, *B. abortus* 870 (6 биовар, референсный), *B. abortus* С-68 (9 биовар, референсный), *B. abortus* 63-75 (7 биовар, референсный), *B. abortus* В-3196 (5 биовар, референсный), *B. abortus* Туля (3 биовар, референсный), *B. abortus* С-548 (6 биовар), *B. abortus* С-549 (6 биовар), *B. abortus* С-550 (3 биовар), *B. abortus* 19 (1 биовар), *B. abortus* С-497, *B. abortus* С-551 (3 биовар), *B. abortus* С-499 (3 биовар), *B. melitensis* 16-М (1 биовар, референсный), *B. melitensis* 63/9 (2 биовар), *B. melitensis* 548 (1 биовар), *B. melitensis* С-554 (3 биовар), *B. melitensis* Rev-1 (1 биовар, вакцинный), *B. melitensis* С-555 (3 биовар), *B. melitensis* С-556 (1 биовар), *B. meliten-*

sis С-557 (1 биовар), *B. melitensis* С-558 (3 биовар), *B. melitensis* С-559 (1 биовар), *B. melitensis* Ether 706 (3 биовар, референсный), *B. melitensis* С-560, *B. melitensis* С-561, *B. melitensis* С-562, (3 биовар), *B. ovis* 707, *B. suis* 61, *B. suis* 513, *B. suis* 1330 (1 биовар, референсный), *B. suis* Thomsen (2 биовар, референсный), *B. suis* 40, *B. suis* 686 (3 биовар, референсный), *B. suis* 484, *B. suis* 539, *B. suis* 513, *B. suis* S-705, *B. suis* 68-86, *B. suis* 68 (4 биовар), *B. suis* 323 (4 биовар), *B. suis* 324, *B. canis* 6/66, *B. canis* 1066 (1 биовар), *B. canis* Н-966, *B. neotomae* 65/198, *B. neotomae* 65/196, *B. neotomae* 325 (1 биовар), *B. neotomae* 66/2 (1 биовар), *B. neotomae* 5К33, *B. suis* И-72, *B. suis* 2-1/20-2, *B. suis* И-299, *B. suis* И-200, *B. ovis* 712, *B. ovis* С-440 (№ 6), *B. ovis* 722; воду ультрачистую (тип I по ASTM) (система Millipore, США), спирт этиловый 96 % (ГОСТ Р 51723-2001), кислоту муравьиную, ~ 98 % (Sigma-Aldrich, США), ацетонитрил (степень чистоты «для ВЭЖХ-МС») (Sigma-Aldrich, США), α-циано-4-гидроксикоричную кислоту (степень чистоты для масс-спектрометрии) (Sigma-Aldrich, США), трифторуксусную кислоту, > 99 %

(Sigma-Aldrich, США), бактериальный тест-стандарт MBT для внутренней калибровки масс-спектрометра (Bruker Daltonics, Германия). Культуры выращивали на агаре Альбими (рН 7,2, прочность 300–380 г по Валенту, содержание аминного азота 100–120 мг %).

Обеззараживание. В качестве объектов исследования использовали культуры 59 штаммов бруцеллеза шести основных патогенных видов (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*). Пробоподготовку и обеззараживание образцов выполняли по методике, описанной ранее F.Lista *et al.* [4]. Инактивированные образцы возбудителя бруцеллеза ресуспендировали в 100 мкл 70 % муравьиной кислоты и 100 мкл ацетонитрила с последующим осаждением центрифугированием в течение 4 мин при 14000 об/мин при температуре 10 °С. Приготовленные белковые экстракты вносили в ячейки стального планшета для MALDI-TOF масс-спектрометрии (Bruker Daltonics, Германия) в объеме 1 мкл. Планшет сушили на открытом воздухе в течение нескольких минут с последующим нанесением поверх раствора матрицы, состоящего из α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в растворе, содержащем 500 мкл ацетонитрила, 475 мкл ультрачистой воды и 25 мкл трифторуксусной кислоты. Плашку высушивали на воздухе до образования кристаллов в течение 5 мин.

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 kV, второго – 17,3 kV, напряжение фокусирующей линзы – 8 kV, напряжение линейного детектора – 2,500 kV, диапазон масс – 2000–20000 Да. Суммарный масс-спектр генерировали из 22 слу-

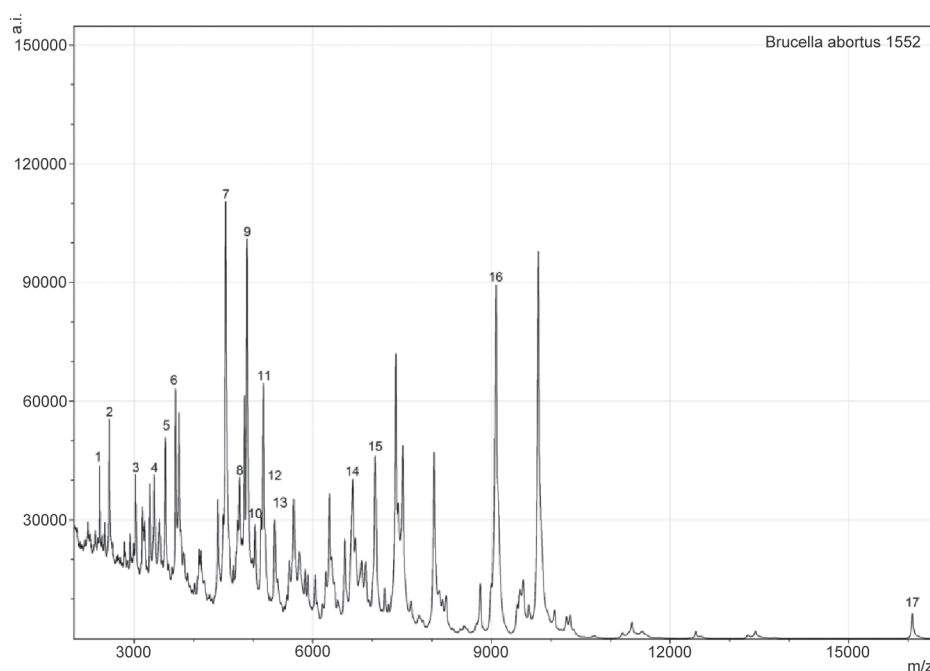
чайно выбранных позиций каждой капли мишени (всего по 4000 выстрелов лазера). Для управления масс-спектрометром использовали программный пакет Daltonics flexControl v 3.3.64 (Bruker Daltonics, Германия), для предварительной оценки интенсивности и разрешения пиков в спектре – flexAnalysis v 3.3.65. Визуализацию и анализ полученных масс-спектров осуществляли в программе mMass v 5.5.0 (<http://www.mmass.org/>).

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

Нами разработан протокол MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа образцов бруцелл, включающий пробоподготовку и параметры формирования масс-спектров, который был апробирован с использованием вирулентного штамма *B. melitensis* 548. Типичный масс-спектр образца, содержащего инактивированную в стандартизованных условиях культуру возбудителя бруцеллеза, представлен на рисунке.

Воспроизводимость масс-профилей отдельных образцов культур бруцелл была подтверждена серией повторных измерений. При проведении масс-спектрометрического анализа проб, хранившихся до 3 сут при температуре –76 °С, изменений основных характеристик сигналов масс-спектров не выявля-



Типичный MALDI-TOF масс-спектр образца *Brucella abortus* 1552 (цифрами 1–17 отмечен набор фрагментов, специфичный для рода *Brucella*)

но. Полученные данные белкового профилирования штаммов возбудителя бруцеллеза согласуются с результатами более ранних работ [4].

Один из ключевых факторов обеспечения достоверности результата анализа методом MALDI-TOF MS – качество масс-спектров. На основании полученных экспериментальных данных нами были определены следующие критерии качества полученных данных: разрешение пиков масс-спектра, соотношение сигнал/шум, общее число идентифицированных пиков в пик-листе, их интенсивность и диапазон значений m/z , регистрируемых в ходе анализа.

Из литературных источников [2, 3] известно, что при сравнительном анализе идентичных фрагментов в целевой области полученных масс-спектрометрических данных наблюдается дрейф – отклонение по величине m/z . Основные причины отклонения гомологичных сигналов могут быть связаны с калибровкой прибора (аппаратный дрейф) и с изменениями, появившимися в ходе субкультивирования и роста культуры (морфологический дрейф).

Непостоянство изотопного состава белков клеток бактерий может служить причиной увеличения дрейфа сигнала до нескольких дальтон. При анализе полученных масс-спектров возбудителя бруцеллеза для диапазона измерений от 2000 до 20000 Да были отмечены различные отклонения по величине m/z . Минимальные отклонения от среднего значения масс-ионов зафиксированы в начале установленной зоны в интервале 2000–5000 Да (до ± 5 Да), максимальный дрейф значений m/z зарегистрирован для конечной области рабочего диапазона (до ± 20 Да).

В результате проведенного анализа полученных пик-листов были определены следующие оптимальные значения характеристик валидного масс-спектра при анализе образцов, содержащих культуры возбудителя бруцеллеза: абсолютная интенсивность пиков $I > 500$, разрешение $R > 150$, общее число идентифицированных пиков от 65 до 100, отношение сигнал/шум – 15.

Нами были отобраны характеристические спектры инактивированных образцов бруцелл для последующего включения в базу данных в среде программы Biotyper v 3.0 (Bruker Daltonics, Германия). Полученные данные проанализированы и сопоставлены с масс-спектрами из электронной библиотеки Bruker Daltonics.

При интерпретации результатов идентификации и дифференциации микроорганизмов с помощью MALDI-TOF MS в среде программы Biotyper часто возникают затруднения, связанные, в первую очередь, с отсутствием в базе данных информации о штаммах возбудителей инфекций, в том числе циркулирующих на территории России, а также сложностью однозначной трактовки конкретных значений Score. В связи с этим следует отметить, что для проведения точной идентификации и типирования возбудителя бруцеллеза методом масс-спектрометрии с помощью программы Biotyper необходимо формиро-

вание представительной базы данных, содержащей масс-спектры высокого качества, полученные в стандартизированных условиях.

Анализ полученных спектров в базе данных Biotyper DB v 3.1.2 показал низкие значения Score (менее 1,397) для всех штаммов возбудителя бруцеллеза относительно других микроорганизмов (общее количество включает более 4600 штаммов (2185 видов, 364 родов) бактерий, микобактерий и др.), на основании чего был сделан вывод о высокой специфичности исследуемых белковых профилей. С другой стороны, сравнение коллекции масс-спектров штаммов бруцелл между собой подтвердило высокую степень родства изучаемых бактерий (Score в интервале 1,946–2,845). Наблюдаемые незначительные различия качественного состава масс-спектров исследуемых бруцелл подтверждают известные факты о консервативности рибосомальных белков микроорганизмов [1], в том числе рода *Brucella*.

На всех изученных спектрах установлено наличие 17 идентичных сигналов, отличающихся по интенсивности ($m/z (\pm 5 \text{ Da})$): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 5036, 4545, 4770, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068).

Кроме того, в пик-листах характеристических масс-спектров исследованных штаммов было установлено наличие общих (групповых) фрагментов для штаммов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* ($m/z (\pm 5 \text{ Da})$): 2245, 2253, 2286, 2455, 3408, 3825, 4066, 4407, 4498, 5537, 6030, 6215, 6745, 6945, 7650, 8110, 8667, 8810, 10073, 10317.

Масс-спектры большинства исследуемых штаммов содержали фрагменты, специфичные для представителей двух видов бруцелл. В частности, для представителей видов *B. melitensis* и *B. canis* были отмечены следующие общие фрагменты ($m/z (\pm 5 \text{ Da})$): 2328, 2410, 2756; *B. melitensis* и *B. suis* ($m/z (\pm 5 \text{ Da})$): 2554, 2680, 4372, 4960, 5230, 5555, 5810, 5840, 6443, 7720, 7848, 9426, 9516, 9647; *B. abortus* и *B. neotomae* ($m/z (\pm 5 \text{ Da})$): 2300, 2387, 2961, 3749, 4107, 4515, 5920, 5940; *B. suis* и *B. ovis* ($m/z (\pm 5 \text{ Da})$): 2266, 2712, 2862, 2918, 3125, 3300, 3320, 4007, 4440, 4871, 5132, 5631.

Наряду с существующей высокой стабильностью родо- и видоспецифичных групп фрагментов, масс-спектры возбудителя бруцеллеза, в ряде случаев (до 30 % исследованных штаммов), содержат значительное количество штаммоспецифичных сигналов, анализ которых позволяет проводить идентификацию патогена до уровня штамма при наличии комплекса родоспецифичных маркеров. Количество уникальных фрагментов в отдельных масс-спектрах варьировало от 1 (*B. abortus* 870) до 10 (*B. melitensis* C-561).

Полученные в результате проведенного исследования данные послужили основанием для разработки алгоритма идентификации возбудителя бруцеллеза с использованием MALDI-TOF MS. Алгоритм включает следующие этапы:

- культивирование микроорганизма на агаре Альбими с соответствующими параметрами в тече-

ние 48 ч;

- обеззараживание образца и пробоподготовка в стандартизованных условиях: одну бактериологическую петлю 48-часовой культуры микроорганизма, выращенной на агаре Альбими, эмульгируют в 300 мкл ультрачистой воды; к полученной суспензии добавляют 900 мкл спирта этилового 96 % и перемешивают, смесь инкубируют при температуре 30 °С в течение 90 мин; после проведенной инактивации образец суспензии дважды центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин, супернатант отбрасывают (дальнейшие исследования проводятся, как с обеззараженным материалом);

- белковая экстракция с использованием муравьиной кислоты: образец ресуспендируют в 100 мкл кислоты муравьиной 70 % и 100 мкл ацетонитрила с последующим осаждением центрифугированием в течение 4 мин при 14000 об/мин при температуре 10 °С; супернатант используют для проведения масс-спектрометрического анализа;

- регистрация суммарного масс-спектра образца на масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, США);

- оценка качества масс-спектра образца на основании анализа значений абсолютной интенсивности (I), разрешения (R), общего числа идентифицированных пиков, отношения сигнал/шум в программе Bruker Daltonics flexControl (или аналогичной);

- анализ пик-листа полученного масс-спектра образца с целью выявления совокупности родоспецифичных фрагментов в интервале масс 2000–20000 Да;

- поиск видо- и штаммоспецифичных фрагментов в интервале масс 2000–20000 Да в случае обнаружения комплекса родоспецифичных фрагментов;

- заключение о результатах идентификации исследуемого микроорганизма.

Таким образом, в настоящее время внедрение MALDI-TOF масс-спектрометрии в систему экспресс-идентификации патогенных микроорганизмов представляет актуальную задачу лабораторной диагностики особо опасных инфекций, требующую разработки стандартизованных подходов к пробоподготовке, формированию и оценке масс-спектров, интерпретации полученных результатов, а также подготовки соответствующего нормативно-методического документа, регламентирующего проведение всех этапов масс-спектрометрического анализа.

В результате проведенных исследований были оптимизированы и стандартизованы параметры

анализа культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, определены критерии качества масс-спектров, в среде программы Biotyper v 3.0 сформирована база характерных (эталонных) масс-спектров для 59 культур возбудителя бруцеллеза из коллекции Ставропольского противочумного института.

Семейство *Brucellaceae* включает 6 близких в эволюционном отношении родов микроорганизмов. В связи с этим также представляет интерес сравнительный масс-спектрометрический анализ образцов, содержащих бактерии семейства *Brucellaceae*, с целью уточнения дискриминирующей способности метода.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. М.: Мир; 1993. Т. 2. 415 с.
2. Wilkins C.L., Lay J.O. Identification of microorganisms by mass spectrometry. Wiley-Blackwell; 2006. 376 p.
3. Ferreira L., Vega S., Sanchez-Juanes F., Gonzalez M., Herrero A., Muñoz M.C., Gonzalez-Buitrago J.M., Muñoz J.L. Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Comparison with routine methods used in clinical microbiology laboratories. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2010; 28:492–7.
4. Lista F., Reubsaet F., De Santis R., Parchen R., de Jong A., Kieboom J., van der Laaken A., Voskamp-Visser I., Fillo S., Jansen H-J., van der Plas J., Paauw A. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiology.* 2011; 11:267. DOI: 10.1186/1471-2180-11-267.

References

1. Marry R., Grenner D., Meyes P., Roduell V. [Human Biochemistry]. M.: "Mir"; 1993. Vol. 2. 415 p.
2. Wilkins C.L., Lay J.O. Identification of microorganisms by mass spectrometry. Wiley-Blackwell; 2006. 376 p.
3. Ferreira L., Vega S., Sanchez-Juanes F., Gonzalez M., Herrero A., Muñoz M.C., Gonzalez-Buitrago J.M., Muñoz J.L. Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Comparison with routine methods used in clinical microbiology laboratories. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2010; 28:492–7.
4. Lista F., Reubsaet F., De Santis R., Parchen R., de Jong A., Kieboom J., van der Laaken A., Voskamp-Visser I., Fillo S., Jansen H-J., van der Plas J., Paauw A. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiology.* 2011; 11:267. DOI: 10.1186/1471-2180-11-267.

Authors:

Ul'shina D.V., Kovalev D.A., Bobrysheva O.V., Lyamkin G.I., Khudoleev A.A., Siritisa Yu.V., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Бобрышева О.В., Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Сирица Ю.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 07.04.15.