

Д.В.Ульшина, Д.А.Ковалев, Д.Г.Пономаренко, Д.В.Русанова, Т.В.Бердникова, А.Ю.Евченко, О.В.Бобрышева, Ю.В.Сирица, С.В.Писаренко, А.М.Жиров, И.В.Кузнецова, Н.Г.Варфоломеева, А.Н.Куличенко

## МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВЫХ ЭКСТРАКТОВ КРОВИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БРУЦЕЛЛЕЗЕ

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Изучить возможность прямого выявления возбудителя бруцеллеза в биоматериале в условиях эксперимента методом MALDI-TOF MS с использованием ресурсов программы Mass-Up и комплекса пакетов для статистического программного обеспечения с открытым исходным кодом R. *Материалы и методы.* В качестве моделей использовали лабораторных мышей, зараженных возбудителями бруцеллеза (штаммы *B. melitensis* 548, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330). Белковое профилирование проводили на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex «Bruker Daltonics». *Результаты.* Используемый биоинформационно-статистический подход для анализа MALDI-TOF масс-спектров позволил проводить прямое выявление бруцелл в биоматериале с последующим определением их видовой принадлежности на основании выявления группы биомаркеров. *Заключение.* Экспериментально подтверждено, что белковые профили экстрактов крови зараженных животных содержат 11 маркеров, в том числе 6 родоспецифичных для микроорганизмов рода *Brucella* spp., которые могут быть ассоциированы с бруцеллезной инфекцией.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 11—18

Ключевые слова: *Brucella* spp., MALDI-TOF MS, белковое профилирование

Д.В.Ульшина, Д.А.Ковалев, Д.Г.Пonomаренко, Д.В.Русанова, Т.В.Бердникова, А.Ю.Евченко, О.В.Бобрышева, Ю.В.Сирица, С.В.Писаренко, А.М.Жиров, И.В.Кузнецова, Н.Г.Варфоломеева, А.Н.Куличенко

## MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF PROTEIN BLOOD EXTRACTS OF ANIMALS WITH EXPERIMENTAL BRUCELLOSIS

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* The aim of the present research was to study the possibility of direct detection of the causative agent of brucellosis in a biomaterial under experimental conditions via the MALDI-TOF MS method using Mass-Up program resources and a set of packages for open-source statistical software R. *Materials and methods.* We used laboratory mice infected with the causative agents of Brucellosis (strains *B. melitensis* 548, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330) as models. Protein profiling was performed on a MALDI-TOF Microflex «Bruker Daltonics» mass spectrometer. *Results.* The bioinformatic-statistical approach used for analyzing MALDI-TOF mass spectra allows to carry out a direct detection of *Brucella* in the biomaterial; besides, it is possible to determinate their species via the identification of a group of biomarkers. *Conclusion.* It was experimentally confirmed that the protein profiles of the blood extracts of infected animals contain 11 markers, including 6 genus specific for *Brucella* spp., which can be associated with *Brucella* infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 11—18

Key words: *Brucella* spp., MALDI-TOF MS, protein profiling

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в работу бактериологических лабораторий активно внедряется технология MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетным разделением), характеризующаяся высокоточной экспресс-идентификацией микроорганизмов, возможностью анализировать материал, контаминированный посторонней микрофлорой и низкой стоимостью анализа.

Для подавляющего большинства микроорганизмов: грамположительные, грамотрицательные, аэробные и анаэробные бактерии, дрожжи и плесень, сформированы базы масс-спектрометрических данных (БД). С одной стороны, можно с уверенностью утверждать, что имеющиеся коммерческие БД позволяют обеспечить проведение рутинной идентификации патогенов, с другой, количество референсных масс-спектров различных видов микроорганизмов составляет лишь малую долю глобального микробного разнообразия, и поэтому имеющиеся базы данных нуждаются в пополнении.

Возможности применения метода MALDI-TOF MS для точной идентификации микроорганизмов на основании анализа их белковых профилей отражены в статье Seng P. с соавторами [7]. По данным авторов диагностическая информативность метода MALDI-TOF MS варьирует в пределах от 90 до 99,9%.

По результатам ранее проведенных нами исследований была доказана эффективность применения MALDI-TOF MS для индикации и межвидовой дифференциации культур бруцелл, выделенных бактериологическим методом из клинического материала [2]. Можно ожидать, что в ближайшие годы MALDI-TOF MS будет использоваться в комплексе с основными методами лабораторной диагностики бруцеллеза благодаря возможности ее применения для экспресс-идентификации и типирования биологических агентов [3; Sali M. et al., 2018].

Известно, что для успешной идентификации культур микроорганизмов необходимого качества масс-спектры могут быть получены при концентрации в исходном образце — не менее  $10^4$  м.к./мл [5]. Кроме того, присутствие различных веществ органической и неорганической природы в клиническом материале может также затруднить прямую индикацию бруцелл. В качестве решения указанной проблемы используют различные способы предварительной подготовки проб: фракционирование, удаление мажорных фракций белков, селективное удаление небелковых примесей и др.

Использование MALDI-TOF MS для выявления возбудителей ООИ, в том числе бруцеллеза, в клиническом материале на настоящий момент включает необходимый этап выделения культуры патогена бактериологическим методом, что затрудняет внедрение подобного подхода в практику ввиду увеличения материальных затрат и продолжительности анализа [6]. Дополнительные временные затраты для реализации данного этапа существенно затрудняют возможность раннего назначения адекватного антибиотика и могут приводить к использованию как недостаточно эффективных, так и избыточных режимов терапии. Применительно к рассматриваемой проблеме сокращение времени инкубации высева первичной гемокультуры с применением специальных способов пробоподготовки позволяет проводить прямую идентификацию первичной гемокультуры, минуя этап субкультивирования [8].

Принимая во внимание все достоинства и возможности метода, наиболее актуальной представляется задача по выявлению на белковых профилях исследуемых культур групп специфичных фрагментов — маркеров с целью их дальнейшего поиска в спектрах образцов клинического материала или биоматериала от животных [4].

В ходе проведенных исследований по изучению культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF MS нами были выявлены группы бруцелла-специфичных фрагментов в диапазоне масс 2000 — 20000 Da ( $m/z$ ,  $\pm 5$  Da): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068 [1].

Для изучения возможности и эффективности применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для прямой детекции возбудителя бруцеллеза в биологических образцах необходимо экспериментальное моделирование инфекции на биомоделях.

Цель работы — изучить возможность прямого выявления возбудителя бруцеллеза в биоматериале с использованием MALDI-TOF MS в условиях эксперимента.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве биологических моделей использовали лабораторных мышей ( $n=20$ ), зараженных возбудителями бруцеллеза (штаммы *Brucella melitensis* 548, *Brucella abortus* 544, *Brucella suis* 1330).

В ходе эксперимента были сформированы четыре группы животных: группу № 1 заражали штаммом *B. melitensis* 548, № 2 — *B. abortus* 544, № 3 — *B. suis* 1330, № 4 — группа сравнения (животные, кровь которых была использована в анализе в качестве отрицательного контроля). Для моделирования инфекции мышам вводили подкожно в паховую область 0,5 мл суспензии соответствующего штамма бруцелл в концентрации  $1 \times 10^5$  м.к./мл в растворе 0,9% хлорида натрия, pH 7,2. Наблюдение за животными проводили в течение 21 сут после заражения.

Через 21 сут после заражения биопробных животных умерщвляли путем хлороформирования. У хлороформированных биомоделей производили взятие крови из сердца в объеме 1,0–1,5 мл. От зараженных животных производили посев паренхиматозных органов и лимфоузлов на агар Альбими, скошенный в пробирках. Посевы культивировали в термостате при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 14 сут. От всех зараженных животных бактериологическим методом была выделена культура бруцелл. Биологическая безопасность работ с культурами возбудителя бруцеллеза была обеспечена в полном объеме в соответствии с требованиями СП 1.3.31.18-13 и МУК 3.1.7.3402—16.

Культуры возбудителя бруцеллеза были выращены на агаре Альбими (pH 7,2 — 7,4, прочность 300 — 380 г по Валенту, содержание аминного азота 100 — 120 мг).

Для проведения исследования использовались: 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),  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота, степень чистоты для масс-спектрометрии (Sigma-Aldrich, США), трифторуксусная кислота > 99% (Sigma-Aldrich, США), бактериальный тест-стандарт МВТ для внутренней калибровки масс-спектрометра (Bruker Daltonics, Германия).

Принимая во внимание внутриклеточную локализацию возбудителя бруцеллеза, в качестве образца для белкового профилирования брали экстракт лейкоцитарной фракции крови, для чего 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 15500 об/мин 10 мин.

Обеззараживание образцов лейкоцитарной фракции осуществляли путем добавления к пробе 70% этилового спирта с последующей инкубацией при температуре  $30^\circ\text{C}$  в течение 90 мин. После проведенной инактивации образцы суспензии центрифугировали и супернатант отбирали. Для полного удаления спирта процедуру центрифугирования повторяли.

После обеззараживания часть осадка высевали на скошенный Бруцеллагар, посевы инкубировали в течение 7 дней при  $37^\circ\text{C}$ . Во время проведения контроля на специфическую стерильность образцы белковых экстрактов хранились при температуре минус 18 —  $20^\circ\text{C}$ . При отсутствии специфического роста в пробирках с Бруцеллагаром исследуемый материал считали обеззараженным.

Белковую экстракцию лейкоцитарной фракции производили смесью 70 % муравьиной кислоты и ацетонитрила. Масс-спектры получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия) в диапазоне масс 2000—20000 Da.

Подготовленные вышеописанным способом пробы в объеме 1 мкл наносили на ячейки стального планшета для MALDI-TOF MS, в течение нескольких минут сушили на открытом воздухе, затем сверху наслаивали раствор матрицы ( $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота в растворе, содержащем 500 мкл ацетонитрила, 475 мкл воды I типа и 25 мкл трифторуксусной кислоты). Плашку высушивали на воздухе в течение 5 минут до образования кристаллов.

Масс-спектры получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex при следующих параметрах: частота лазера 60 Гц, интенсивность лазера 10–50%, время задержки экстракции 110 нс PIE, напряжение первого источника ионов 19,4 kV, второго — 17,3 kV, напряжение фокусирующей линзы 8 kV, напряжение линейного детектора 2,500 kV, диапазон масс  $m/Z$  2000–20000 Da. Внутреннюю калибровку диапазона  $m/Z$  проводили с использованием точных значений масс бактериального тест-стандарта MBT (Bruker Daltonics, Германия) в автоматическом режиме.

Для управления масс-спектрометром, включая установку режимов работы и регистрации масс-спектров, 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. Формирование промежуточных таблиц проводили с использованием программных ресурсов пакета Microsoft Office 2010. Статистический анализ и визуализацию полученных данных осуществляли с помощью интегрированных пакетов «MALDIquant», «MALDIquantForeign», «sda» (<https://cran.r-project.org/web/packages/rgl/index.html>), (<http://strimmerlab.org/software/maldiquant/>) языка программирования R (<https://cran.r-project.org/>) и Mass-Up (<http://sing.ei.uvigo.es>).

Полученные в ходе работы масс-спектры для каждого анализируемого образца использовали для построения дендрограммы средствами программного пакета «MALDIquant», реализованного в среде R, представляющего альтернативу для интерпретации данных MALDI-TOF MS. Представление полученных масс-спектров в виде иерархической структуры позволило определить положение каждого отдельного спектра на основании величины сходства характеристик его пиков от средних значений характеристик в группе спектров. Результативность кластерного анализа достигается использованием метрики дистанций  $d(x, y)$ , при этом расстояние между объектами одной группы в целом будет меньше « $e$ », а между объектами из разных групп больше « $e$ », где « $e$ »  $> 0$  — задаваемый уровень сходства.

Построение собственного дерева для каждой повторной выборки с вычислением частоты встречаемости всех фрагментов в сформированной последовательности производили с использованием бутстреп-вероятности BP. Гипотезу о существовании кластера считали достоверной, если с ветвями бутстрепного дерева связывалась вероятность, превышающая 70%. Построение дендрограммы проводили в евклидовом пространстве на основании данных матрицы признаков «featureMatrix».

В качестве метода для создания классификаций масс-спектров использовали анализ главных компонент (principal component analysis, PCA), основное преимущество которого заключается в том, что из совокупности характеристик объекта наблюдения (в данном случае — масс-спектр образца) выбирают наиболее переменные величины (с точки зрения исследователя), значения которых откладывают по осям трехмерной системы координат (главные компоненты) и на пересечении перпендикуляров из этих осей ставят точку. Используемое программное обеспечение позволило представить PCA-кластер в трехмерном пространстве.

В качестве маркеров использовали сигналы,  $p$ -значение которых было меньше 0,05 (<https://www.sing-group.org/mass-up/manual>). Частоту встречаемости каждого потенциального маркера рассчитывали с использованием пакета прикладных программ Statistica v 10.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценку особенностей белковых профилей экстрактов крови мышей, зараженных бруцеллами, проводили при сравнении с масс-спектрами отрицательного контроля (кровь мышей из контрольной группы). Каждый образец анализировали в четырех повторах.

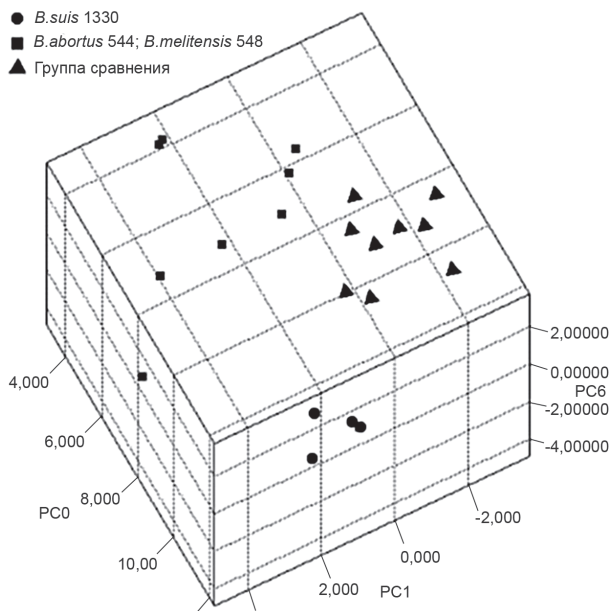
По результатам качественного и количественного анализа данных наименьшее количество пиков ( $40 \pm 2$ ) содержали масс-спектры экстрактов крови животных, зараженных *B. suis* 1330. Наиболее представительные спектры ( $79 \pm 3$  и  $69 \pm 3$ ) были получены для образцов крови мышей, которым вводили *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 548, соответственно.

На масс-спектрах белковых экстрактов крови мышей из групп сравнения основное число сигналов было локализовано в двух областях значений масс рабочей области: 2,6—8,5 и 13,5—16,0 kDa. В результате сравнительного анализа белковых профилей образцов отрицательного контроля были установлены общие фрагменты, значения абсолютной интенсивности которых варьировало в диапазоне от 250 до  $2,0 \times 10^4$  a.i. ( $m/z \pm 5$  Da): 2683, 2739, 2925, 3140, 3327, 4195, 4286, 5005, 5660, 6908, 7228, 7506, 11682, 14992, 15001. Разрешение для перечисленных сигналов находилось в диапазоне от 205 до 436, отношение сигнал/шум — от 6/1 до 19/1, ширина пика на полувысоте — от 11 до 52, частота регистрации составляла  $\geq 0,99$ . Указанные значения параметров полученных масс-спектров являются приемлемыми для дифференциации аналитически значимых фрагментов из всего массива сигналов. При этом, области  $m/Z$ , содержащие сигналы с высоким значением абсолютной интенсивности, перекрывались с областями значений масс, в которых регистрировались специфичные для представителей рода *Brucella* пики, что затрудняло выявление бруцелла-специфичных сигналов на масс-спектрах экстрактов крови мышей, зараженных возбудителем бруцеллеза.

Основное количество зарегистрированных пиков на масс-спектрах белковых экстрактов лейкоцитарной фракции крови мышей, зараженных возбудителем бруцеллеза, было расположено в интервале значений масс 2,0 — 8,3 и 14,5–1,6 kDa рабочей области. Анализ MALDI-TOF масс-спектров белковых экстрактов лейкоцитов крови инфицированных животных всех групп позволил выявить общие пики ( $m/z \pm 5$  Da): 2250, 2581, 3025, 3640, 3696, 3754, 4545, 6672, 7905, 8351, 14504 (курсивом отмечены родоспецифичные маркеры возбудителя бруцеллеза). Интенсивность указанных фрагментов находилась в диапазоне от 300 до 6000 a.i., разрешение — от 269 до 534, отношение сигнал/шум — от 8/1 до 24/1, ширина пика на полувысоте — от 6 до 59. Указанные параметры общих сигналов позволяют достоверно их дифференцировать от совокупности всех пиков. Частота регистрации шести родоспецифичных сигналов бруцелл, отличающихся по абсолютной интенсивности, составляла 0,98.

В ходе сравнительного анализа белковых профилей экстрактов лейкоцитов крови мышей, инфицированных культурой *B. abortus* 544, были установлены специфичные для этой группы сигналы ( $m/z \pm 5$  Da): 2322, 2334, 4941, 6257, 10781, 10798, 11000, 12117, 13609. На масс-спектрах белковых экстрактов лейкоцитов крови животных, зараженных *B. melitensis* 548, было выявлено 2 общих сигнала ( $m/z \pm 5$  Da): 2264, 8378. Наибольшее количество уникальных фрагментов отмечено на белковых профилях экстрактов крови мышей 3 группы (*B. suis* 1330) ( $m/z \pm 5$  Da): 2133, 2422, 2455, 2545, 2754, 3050, 3107, 3268, 3842, 3885, 3902, 3927, 3970, 4067, 4796, 4856, 4871, 4896, 5114, 5219, 5235, 5250, 6621, 6640, 7106, 7155, 7172, 7336, 7360, 7386, 7550, 7777, 7854, 7992, 8917, 10289, 10332, 12699, 14256, 14346, 14362, 14468, 14698, 14864, 15858, 15904. Очевидно, что заражение модельных животных возбудителем бруцеллеза сопровождается появлением специфичных сигналов на соответствующих белковых профилях экстрактов крови.



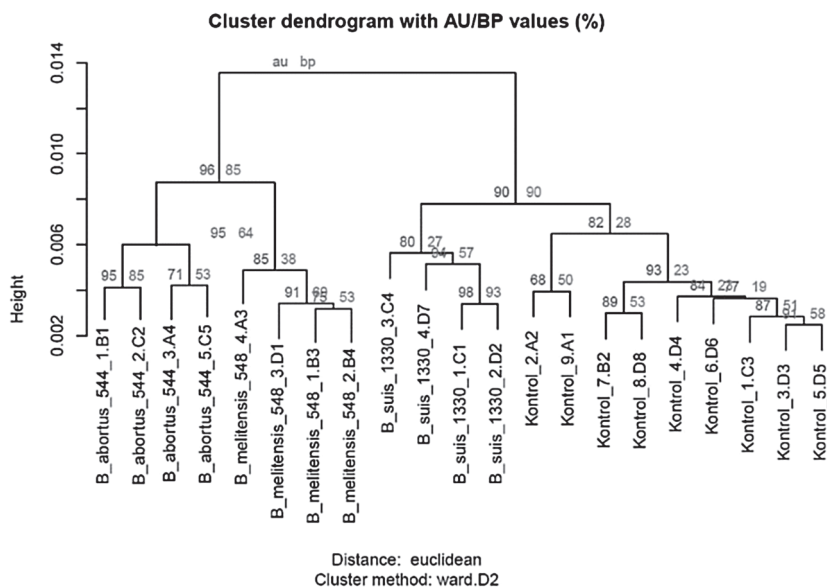


**Рис. 1.** Диаграмма распределения масс-спектров экстрактов лейкоцитов крови мышей, зараженных культурами *B. abortus* 544, *B. melitensis* 548 и *B. suis* 1330, а также из группы сравнения на основании результатов анализа MS профилей методом PCA

Формирование отдельного кластера образцами лейкоцитарной фракции крови животных, зараженных *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 548, на дендрограмме (рис. 2) в полной мере согласуется с общеизвестными данными о генетической близости представителей указанных двух видов бруцелл и с результатами на основании анализа сходства белковых профилей их культур. Образцы отрицательного контроля

Визуализация данных, построенная методом PCA с использованием ресурсов статистического программного обеспечения Mass-Up (рис. 1) отражает распределение проб крови искусственно инфицированных животных компактно и дискретно от крови мышей из группы сравнения в виде совокупности точек в пространстве (PCA-кластер).

На диаграмме можно отметить четкое разделение белковых профилей экстрактов крови мышей при остром бруцеллезе на две группы: первую образуют животные, зараженные культурами *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 548, во вторую вошли животные, инфицированные *B. suis* 1330. Распределение образцов на основании MS данных полностью совпадает с видовой принадлежностью используемых при заражении штаммов бруцелл.



**Рис. 2.** Дендрограмма масс-спектров проб крови мышей из групп сравнения

формировали отдельную группу. Пробы крови животных, зараженных культурами *B. suis* 1330, также формировали компактную группу, по сравнению с образцами крови мышей, зараженных культурами *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 548. Возможно, подобное расположение является следствием того, что белковые профили проб лейкоцитов крови животных, зараженных культурами *B. suis* 1330, характеризовались наименьшей представительностью (количество и интенсивность сигналов) по сравнению с образцами от животных, зараженных *B. abortus* 544, *B. melitensis* 548.

Таким образом, в ходе работы была подтверждена возможность прямого выявления специфичных маркеров возбудителя бруцеллеза в биоматериале методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце на стадии подростка гемокультур на питательных средах. В результате сравнительного анализа белковых профилей экстрактов лейкоцитов крови животных при остром бруцеллезе описано 6 общих родоспецифичных сигналов *Brucella* spp. ( $m/z \pm 5$  Da): 2581, 3025, 3696, 3754, 4545, 6672, позволяющих достоверно определить образцы инфицированных бруцеллезом животных.

Результаты MALDI-TOF MS исследования культур возбудителя бруцеллеза подтверждают сложность проведения межвидовой дифференциации близкородственных видов бруцелл на основе данных белкового профилирования. Вместе с тем, на основании полученных данных, распределение спектров проб лейкоцитарной фракции крови животных, инфицированных разными видами бруцелл, на построенной дендрограмме полностью согласуется с видовой принадлежностью исследуемых штаммов. Присутствие различий на белковых профилях экстрактов лейкоцитов крови мышей, инфицированных культурами возбудителя бруцеллеза, очевидно, обусловлено не только индивидуальными особенностями используемых культур бруцелл разных видов, но и их адаптивными изменениями в организме животных в условиях персистенции возбудителя. Следовательно, при нахождении в организме хозяина возбудитель инфекции подвергается воздействию иммунной системы, что, вероятно, обуславливает синтез патогеном определенных белков, экспрессия которых вне организма хозяина отсутствует.

Описанные родо- и видоспецифичные для бруцелл особенности масс-спектров экстрактов лейкоцитов крови при остром бруцеллезе могут быть использованы при разработке эффективного методического подхода для индикации и идентификации возбудителя бруцеллеза в клиническом материале и биоматериале от сельскохозяйственных животных с использованием MALDI-TOF MS.

Таким образом, результаты экспериментального исследования позволяют говорить о высокой диагностической информативности метода MALDI-TOF MS для прямого выявления белковых маркеров бруцелл в биоматериале и последующего определения их видовой принадлежности, что требует дальнейших исследований. Впервые охарактеризованы ассоциированные с бруцеллезной инфекцией 11 белковых маркеров, в том числе 6 родоспецифичные для микроорганизмов рода *Brucella* spp., которые могут быть использованы при разработке эффективного методического подхода для диагностики бруцеллеза методом MALDI-TOF MS.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Бобрышева О.В., Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Сирица Ю.В., Куличенко А.Н. Разработка алгоритма идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 4: 96-99.
2. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Бобрышева О.В., Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Ковалева Н.И., Куличенко А.Н. Применение времяпролетной масс-спектрометрии для диагностики бруцеллеза и межвидовой дифференциации штаммов *Brucella* spp. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018, 7 (4): 15-24.
3. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Чайка И.А., Чайка С.О., Водопьянов А.С. Масс-спектрометрический анализ природных и антиген-измененных штаммов туляремиального микроба. Проблемы особо опасных инфекций. 2017, 4: 92-96.

4. Cheng D., Qiao L., Horvatovich P. Toward Spectral Library-Free Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Bacterial Identification. *Journal of proteome research*. 2018, 17 (6): 2124-2130.
5. Hsieh S.Y., Tseng C.L., Lee Y.S. et al. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol. Cell Proteomics*. 2008, 7: 448-456.
6. Köck R., Wüllenweber J., Horn D. et al. Implementation of short incubation MALDI-TOF MS identification from positive blood cultures in routine diagnostics and effects on empiric antimicrobial therapy. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2017, 6 (1): 12-18.
7. Seng P., Abat C., Rolain J.M. et al. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2013, 51: 2182-2194.
8. van Belkum A., Welker M., Pincus D. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: what are the current issues? *Annals of laboratory medicine*. 2017, 37 (6): 475-483.

Поступила 26.02.19

Контактная информация: Ульшина Д.В.,  
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р. т. (8652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Е.А.Котенева, Е.С.Котенев, А.В.Калинин, Н.С.Царева, Л.А.Кот, Н.В.Жаринова, А.А.Зайцев, Г.А.Печковский*

## **ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА И ЗАКАВКАЗЬЯ**

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Создание базы данных масс-спектров штаммов *Yersinia pestis*, позволяющей дифференцировать штаммы основного и кавказского подвидов возбудителя чумы методом MALDI-TOF MS. *Материалы и методы.* Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии было исследовано 50 штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на территории 7 природных очагов чумы Кавказа и Закавказья в период 1950-2012 г. Снятие масс-спектров экстрактов клеток *Y. pestis* проводили с использованием масс-спектрометра Microflex LT «Bruker Daltonics». Результаты обрабатывали и анализировали в программах «FlexAnalysis» и MALDI Biotyper v. 3.0. *Результаты.* Показано, что масс-спектры имеют характерные особенности, позволяющие дифференцировать штаммы основного (*pestis*) и неосновного подвидов. Выявлены пики, характерные для каждого подвида, наличие у *Y. pestis* подвида *saucasica* пиков, характерных для предковой формы — *Y. pseudotuberculosis* указывает на древнее происхождение этой группы, что согласуется в данными молекулярно-генетического и WGS анализа, приведенными в публикациях отечественных и зарубежных авторов. *Заключение.* Показана возможность применения метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для быстрой дифференциации штаммов чумы основного и неосновного подвида, имеющих разное значение в развитии и поддержании эпизоотического процесса в природных очагах чумы, а также разную вирулентность для человека. Идентификация штамма до уровня подвида требует проведения культуральных и биохимических тестов, которые могут занять несколько суток. Предлагаемый метод позволяет провести дифференциацию и получить результат уже через полчаса после получения чистой культуры.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 18—25

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, MALDI-TOF масс-спектрометрия, внутривидовое типирование штаммов, природные очаги чумы, идентификация штаммов, специфические пики