

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-147-155

УДК 616.98:579.852.11

Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Е.И. Еременко, О.В. Семенова, А.Г. Рязанова, О.В. Бобрышева,
А.М. Жиров, А.Н. Куличенко

Оценка аналитических возможностей MALDI-TOF масс-спектрометрии при молекулярном типировании *Bacillus anthracis*

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Цель исследования – сравнить дискриминирующую способность методов canSNP13-генотипирования и MALDI-TOF масс-спектрометрии на основании результатов исследования штаммов возбудителя сибирской язвы, принадлежащих к двум основным генетическим линиям А и В. **Материалы и методы.** Исследовано 73 штамма *Bacillus anthracis* из коллекции микроорганизмов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Белковое профилирование проводили на масс-спектрометре Microflex, анализ данных – в среде языка статистического программирования R. **Результаты и обсуждение.** Экспериментально подтверждено, что предлагаемый подход для дифференциации протеотипов штаммов *B. anthracis* с индексом дискриминации 0,952 превышает таковой для метода canSNP-типирования и сопоставим с индексом дискриминации для метода MLVA31. Корреляция результатов кластеризации штаммов при типировании методами MALDI-TOF масс-спектрометрии и canSNP-генотипирования достигает 95 % в отношении разделения на главные генетические линии А и В. Изученные штаммы сибирезявленного микроба, относящиеся в большинстве случаев к филогенетическим группам линии А, представляют собой более десятка белковых профилей, что может быть связано с различиями в уровне экспрессии белков у штаммов каждого canSNP-генотипа. MALDI-TOF масс-спектрометрия позволяет получить сопоставимые с генетическими тестами результаты, имеет лучшую дискриминирующую способность по сравнению с canSNP-типированием, более проста в выполнении.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, MALDI-TOF MS, белковое профилирование.

Корреспондирующий автор: Ульшина Диана Васильевна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Еременко Е.И., Семенова О.В., Рязанова А.Г., Бобрышева О.В., Жиров А.М., Куличенко А.Н. Оценка аналитических возможностей MALDI-TOF масс-спектрометрии при молекулярном типировании *Bacillus anthracis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 3:147–155. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-147-155

Поступила 07.12.2022. Отправлена на доработку 10.02.2023. Принята к публ. 14.03.2023.

D.V. Ul'shina, D.A. Kovalev, E.I. Eremenko, O.V. Semenova, A.G. Ryazanova, O.V. Bobrysheva,
A.M. Zhiron, A.N. Kulichenko

Evaluation of the Analytical Capabilities of MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Molecular Typing of *Bacillus anthracis*

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to compare the discriminating capacity of the canSNP13 genotyping and MALDI-TOF mass spectrometry methods based on the results of the study of anthrax pathogen strains belonging to the two main genetic lines A and B. **Materials and methods.** 73 *Bacillus anthracis* strains from the collection of microorganisms of the Stavropol Research Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor were investigated. Protein profiling was carried out using a Microflex mass spectrometer, data processing – in the environment of the statistical programming language “R”. **Results and discussion.** It has been experimentally confirmed that the proposed approach for differentiating proteotypes of *B. anthracis* strains with a discrimination index of 0.952 exceeds the one for the canSNP typing method and is comparable to the discrimination index for the MLVA31 method. The correlation of the results of strain clustering during typing by MALDI-TOF mass spectrometry and canSNP genotyping reaches 95 % as regards the division into the main genetic lines A and B. The studied strains of anthrax microbe, which mostly fall under phylogenetic groups of lineage A, represent more than a dozen protein profiles, which may be due to differences in the level of protein expression in strains of each canSNP genotype. MALDI-TOF mass spectrometry makes it possible to obtain the results comparable with genetic tests, has a better discriminating capacity compared to canSNP typing, and is easier to perform.

Key words: *Bacillus anthracis*, MALDI-TOF MS, protein profiling.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Diana V. Ul'shina, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Citation: Ul'shina D.V., Kovalev D.A., Eremenko E.I., Semenova O.V., Ryazanova A.G., Bobrysheva O.V., Zhiron A.M., Kulichenko A.N. Evaluation of the Analytical Capabilities of MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Molecular Typing of *Bacillus anthracis*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 3:147–155. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-147-155

Received 07.12.2022. Revised 10.02.2023. Accepted 14.03.2023.

Ul'shina D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>
Kovalev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>
Eremenko E.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1117-1185>
Semenova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0274-898X>

Ryazanova A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>
Bobrysheva O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6338-4476>
Zhiron A.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>
Kulichenko A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Сибирская язва – особо опасная инфекционная болезнь многих видов животных и человека, вызываемая бактериями *Bacillus anthracis*, регистрируется с разной степенью интенсивности по всему миру [1]. Наиболее крупная вспышка сибирской язвы за минувшее десятилетие в России, зарегистрированная на территории Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО) в 2016 г., привела к заболеванию 36 человек (один летальный исход) и 2650 северных оленей [2].

Внутривидовое типирование *B. anthracis* используется при анализе вспышек сибирской язвы, в частности когда нужно провести сравнение генетических линий изолятов, полученных из материала от животных или объектов внешней среды, с культурами, изолированными от заболевших людей, с целью установления источника инфекции и происхождения штамма, вызвавшего заболевание. Методы молекулярного типирования возбудителя сибирской язвы характеризуются различными дискриминирующими возможностями. MLST-типирование изолятов *B. anthracis*, обладая относительно низкой разрешающей способностью (индекс дискриминации составляет 0,58), позволяет получить общую генетическую характеристику штаммов патогена без корректной их дифференциации [3]. Широко используемое *can*SNP-генотипирование применяется при дифференциации штаммов *B. anthracis* с возможностью установления их расположения в глобальной структуре популяции, представленной тремя главными генетическими линиями (клады) – А, В и С – и насчитывающей 12 «канонических» SNP-групп.

Высокая дифференцирующая способность методов MLVA, в частности MLVA31 (индекс дискриминации достигает 0,99), обуславливает возможность проведения как точной дифференциации, так и определения генетического родства исследуемых штаммов [4]. Несмотря на все преимущества MLVA-технологии, необходимо отметить, что анализ 31 VNTR-локусов является относительно дорогостоящим и длительным по времени. Наиболее полную информацию о структуре генома патогена в настоящее время получают методом полногеномного секвенирования, с помощью которого определяют MLST-, SNP-, MLVA-генотипы штаммов *B. anthracis in silico*. Высокая дискриминирующая способность этого метода позволяет осуществлять наиболее точную дифференциацию исследуемых штаммов возбудителя сибирской язвы. Основное ограничение, препятствующее широкому использованию полногеномного секвенирования, заключается в высокой стоимости реагентов и приборной базы.

В последнее время наблюдается активное развитие другой эффективной технологии для детекции и типирования микроорганизмов – времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS), позволяющей анализировать качественный и количественный белковый состав микроорганизмов. Известно, что спектры рибосомных белков, относя-

щиеся к группе наиболее стабильных, широко используются для осуществления идентификации бактерий на уровне не только рода, но и вида. Метод MALDI-TOF MS позволяет проводить выявление и анализ белковых биомаркеров, представляющих собой комплекс типичных белков «домашнего хозяйства» [5, 6]. Типирование микроорганизмов на основе белковых биомаркеров позволяет устанавливать филогенетические связи и представлять их в формате филогенетического дерева, отражающего степень эволюционной близости представителей исследуемого бактериального патогена. Показано, что результаты кластерного анализа на основе масс-спектрометрических данных соотносились с данными VNTR-кластеризации *B. anthracis*, и высказано мнение, что продемонстрированный потенциал MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа позволяет рассматривать этот метод не только в качестве идентификационного, но и в качестве дополнительного метода углубленного изучения возбудителя [7].

В нормативно-методических документах федерального уровня четкие указания, регламентирующие роль (место) масс-спектрометрических методов исследования в системе мониторинга опасных инфекционных и паразитарных болезней, отсутствуют. Учитывая, что MALDI-TOF MS позволяет успешно проводить дифференциацию видов и подвидов патогенных микроорганизмов, представляется актуальным оценить дискриминирующий потенциал этого метода применительно к *B. anthracis* [8, 9].

Цель исследования – сравнить дискриминирующую способность методов *can*SNP13-генотипирования и MALDI-TOF MS на основании результатов исследования штаммов возбудителя сибирской язвы, принадлежащих к двум основным генетическим линиям А и В.

Материалы и методы

Исследовали 73 штамма *B. anthracis* из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Использовали ацетонитрил (Sigma-Aldrich, США), трифторуксусную кислоту (Sigma-Aldrich, США), α -циано-4-гидроксикоричную кислоту (Bruker Daltonics, Германия), Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (Becton Dickinson, США), агар, порошок микробиологический, бактериальный тест-стандарт MBT для внутренней калибровки масс-спектрометра (Bruker Daltonics, Германия).

Подготовка проб и обеззараживание. Вся работа с исследуемым материалом проводилась в соответствии с СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Выращивали 18–24 ч культуры *B. anthracis* из отдельных колоний на пластинках BHIA при 37 °С. При обеззараживании 20 мкл взвеси культуры суспендировали в 80 мкл трифторуксусной кислоты, выдерживая при ком-

натной температуре в течение 5 мин, затем центрифугировали в течение 30 мин при 13000 об/мин. Супернатант переносили в ультрамикробиологическую пробирку с диаметром пор 0,22 мкм, центрифугировали при 13000 об/мин в течение 20 мин. С полученным фильтратом работали как с обеззараженным материалом. На пластину-мишень MS 96 Micro SCOUT Plate (Bruker Daltonics, Германия) помещали 1 мкл фильтрата, покрывали 1 мкл матрицы, состоящей из α-циано-4-гидроксикоричной кислоты в растворе ацетонитрила, ультрачистой воды и трифторуксусной кислоты.

Получение и статистическая обработка масс-спектрометрических данных. Масс-спектры получали в линейном режиме на масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия), диапазон масс – 2–20 кДа. Обработку, визуализацию и анализ полученных масс-спектров осуществляли с применением прикладных пакетов [10] в статистическом программном обеспечении R (<https://cran.r-project.org>) и Mass-Up (<http://sing.ei.uvigo.es>). Эффективность про-

граммного обеспечения была подтверждена нами ранее в ходе исследований по индикации и идентификации *Brucella* spp., *B. anthracis* [11].

Построение дендрограммы на основании данных MALDI-TOF MS. Объединение схожих спектров в группы проводили методом кластерного анализа, в качестве метрики задавали евклидово расстояние. Степень сходства масс-спектров представили как величину, тождественно равную расстоянию между объектами. Построили матрицу расстояний, учитывающую значение m/Z и интенсивность каждого сигнала. Иерархическую кластеризацию штаммов сибиреязвенного микроба представили в виде дендрограммы (рисунок). Расстояние между кластерами определяли методом Варда, отражающим объединение субгрупп, характеризующихся наибольшим сходством.

canSNP типирование. Для анализа канонических SNP с группировкой в 12 групп использовали сконструированную in-house тест-систему с праймерами [12] и флуоресцентно-мечеными LNA-зондами, последовательности которых приведены в табл. 1.

Таблица 1 / Table 1

Последовательности праймеров и зондов для canSNP-анализа
Sequences of primers and probes for canSNP-analysis

№ No.	Can SNP	Последовательность нуклеотида 5'→3' The sequence of nucleotide 5'→3'	
		Праймеры Primers	Зонды Probes
1	A.Br.001	F:CAAGCGGAACCAAATTTAATCTTT	FAM-ACCGAA <u>ACTTGA</u> AGTC-BHQ1
		R:TTCACCGTACGTCATTGTATAATACG	VIC-AACCGAA <u>ATTGGA</u> AGTC-BHQ2
2	A.Br.002	F:AACGATACCTAAAATCGATAAAG	FAM-CGCCCA <u>GCCTAA</u> -BHQ1
		R:GGCAGAAGGAGCAAGTAATGTT	VIC-CGCCCA <u>ACCTAAAC</u> -BHQ2
3	A.Br.003	F:GCTACTGTCATTGTATAAAAACCTCCTTT	FAM-ACCTCAA <u>GCTTAATTCG</u> -BHQ1
		R:CGCTTGCCAAGCTTTTTTTTC	VIC-CTACCTCAA <u>ACTTAATTCGA</u> -BHQ2
4	A.Br.004	F:CCGATACCAGTAAACGACGACAT	FAM-TGGAATG <u>CCCTAATC</u> -BHQ1
		R:CTGGAATTGGTGGAGCTATGGA	VIC-TGGAATG <u>ICCTAATCC</u> -BHQ2
5	A.Br.006	F:CCGAAATTGCTATTAGAACGAA	FAM-TCGCCT <u>CGTGCAT</u> -BHQ1
		R:TCCCAATCTAGCGTTTTTAAGTCA	VIC-ATCGCCT <u>AGTGCATG</u> -BHQ2
6	A.Br.007	F:TTGGTAACGAGACGATAAACTGAATAA	FAM-CCATCCTT <u>ATATCAGCT</u> -BHQ1
		R:GCCTTGGATTGGCGATTG	VIC-CATCCTT <u>ACATTCAGCT</u> -BHQ2
7	A.Br.008	F:TTCGCAACTACGCTATACGTTTTAGAT	FAM-TTCTTC <u>CGCGCTTG</u> -BHQ1
		R:CAAACGGTGAAAAAGTTACAAATATACG	VIC-AATTCCTT <u>ICCGCTTG</u> -BHQ2
8	A.Br.009	F:GGCAATCGGCCACTGTTT	FAM -GGCTTT <u>GCTTGCATC</u> -BHQ1
		R:GGGTTTCTACTGTGTATGTTGTTAATAAAAAAG	VIC-CGGCTTT <u>ACTTGCATC</u> -BHQ2
9	B.Br.001	F:TGCATGCTTCTTCTTACAGAGTAGTAAAT	FAM-GATACCTTCTT <u>ATCTCTTC</u> -BHQ1
		R:CGGTCATAAAAAGAAATCGGTACAA	VIC-GATACCTTCTT <u>ATCTCTTC</u> -BHQ1
10	B.Br.002	F:TGTTGCACCTTCTGTGTTCGTT	FAM-ACGTTACT <u>CTGTTCCT</u> -BHQ1
		R:GTAGTGGCTTCCACGAATGGA	VIC-AACGTTACT <u>CTGTTCCT</u> -BHQ1
11	B.Br.003	F:CATTATTTCGCATAGAAGCAGATGA	FAM-ACATATCC <u>ACTTACGTT</u> -BHQ1
		R:TGTGCCATCAAATAACTCTTTCTCAA	VIC-CATATCCGCTT <u>ACGTT</u> -BHQ1
12	B.Br.004	F:GAAGTTAAGTATCAACCAGCAGAAGAAA	FAM-TTACTTCTA <u>ICATCCCGT</u> -BHQ1
		R:CCGCCGCTTGAGCTT	VIC-TACTTCTA <u>CATCCCGT</u> -BHQ1
13	A/B.Br.001	F:GAAGGTCTCCAATTTGGATTTAAAT	FAM-TTTT <u>ATTAGATAGCGC</u> -BHQ1
		R:CGTGTGAACCTTTCGGTAAATAGTC	VIC-TTTT <u>ATTAGATAGCGC</u> -BHQ1

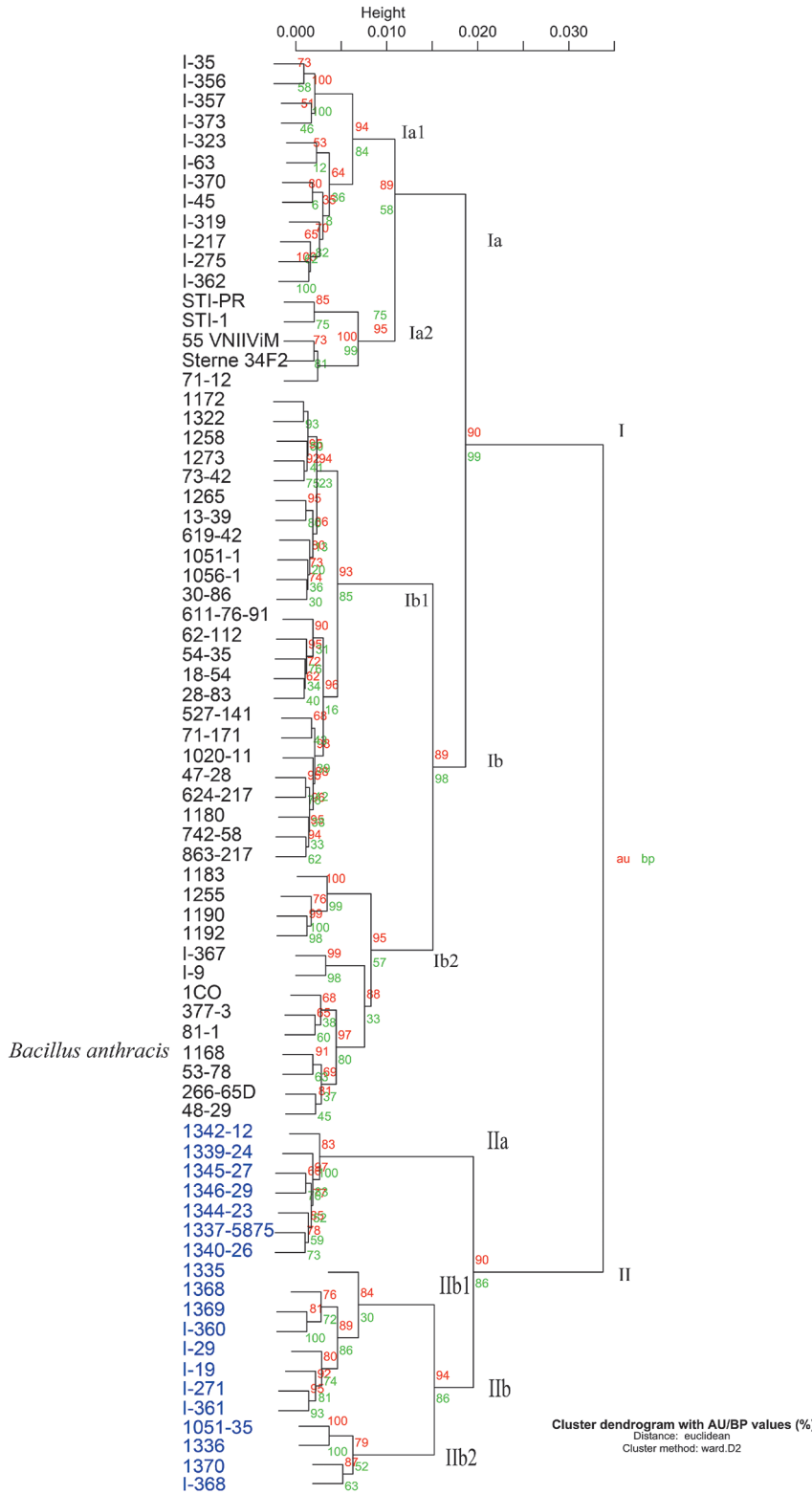
Примечание: подчеркнуты LNA-основания.

Note: LNA bases are underlined.

Определение индекса дискриминации Хантера – Гастона проводили в соответствии с методикой P.R. Hunter *et al.* [13]. Построение дендрограммы на основании результатов *can*SNP-анализа проводили в программе MEGA X (не представлена) с использованием алгоритма Maximum Likelihood (рисунок).

Результаты и обсуждение

Результаты анализа штаммов *B. anthracis* с помощью *can*SNP-генотипирования. Установлена принадлежность штаммов *B. anthracis* к двум филогенетическим линиям (А, В) и пяти подгрупп



Дендрограмма MALDI-TOF масс-спектров штаммов *B. anthracis*. Штаммы из *can*SNP-группы B.Br.002 (ветвь II) выделены синим цветом

Dendrogram illustrating the phylogenetic relations of *B. anthracis* strains based on MALDI-TOF MS data. Strains from *can*SNP group B.Br.002 (branch II) are highlighted in blue

Таблица 2 / Table 2

canSNP-генотипы исследуемых штаммов
canSNP genotypes of the studied strains

Кол-во штаммов Number of strains	SNP													canSNP-группа canSNP group
	A001	A002	A003	A004	A006	A007	A008	A009	B001	B002	B003	B004	A/B001	
41	T	G	A	T	A	T	G	A	T	G	G	T	A	A.Br.008/009
7	T	G	G	C	A	T	T	A	T	G	G	T	A	A.Br.Aust94
2	T	A	G	C	A	T	T	A	T	G	G	T	A	A.Br.001/002
5	C	A	G	C	A	T	T	A	T	G	G	T	A	A.Br.Ames
18	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002

пам: А) A.Br.Ames, A.Br.Australia 94 (A.Br.Aust94), A.Br.001/002 и A.Br.008/009; В) B.Br.001/002 (табл. 2).

По данным canSNP-генотипирования (табл. 3), в наиболее представительную группу A.Br.008/009 основной генетической линии А вошли 41 штамм, изолированные на территориях Харьковской, Тюменской и Омской областей, Азербайджанской, Чеченской и Карачаево-Черкесской республик, республик Дагестан, Северная Осетия – Алания,

Ингушетия, Калмыкия, Тыва, Бурятия, а также Ставропольского, Забайкальского, Красноярского и Приморского краев в период с 1962 по 2013 г.

В этой же группе расположились вакцинные штаммы: 55-ВНИИВиМ, СТИ-1, СТИ-ПР, 71/12. Группу A.Br.Ames составляли изоляты, выделенные с 1965 по 2012 г. в Республике Бурятия, Омской области и Алтайском крае. К канонической группе A.Br.014(A.Br.Aust94) отнесены штаммы, изолированные на территории республик Дагестан, Северная Осетия – Алания

Таблица 3 / Table 3

Филогенетические взаимоотношения штаммов *B. anthracis* на основе данных canSNP-анализа и MALDI-TOF MS

Phylogenetic relations of *B. anthracis* strains based on canSNP analysis and MALDI-TOF MS data

Наименование штаммов Designation of strains	Тип масс-спектр MALDI-TOF / n – число штаммов Type of mass spectrum MALDI-TOF / n is the number of strains
Филогенетическая группа A.Br.008/009, n=41 Phylogenetic group A.Br.008/009, n=41	
I-356, I-323, I-275, I-217, I-63	Ia1 / n=5
СТИ-ПР, СТИ-1, 55-VNIIViM, 71-12	Ia2 / n=4
13-39, 611-76-91, 1322, 1273, 1265, 1258, 1180, 1172, 1056-1, 1051-1, 1020-11, 863-217, 742-58, 624-217, 619-42, 527-141, 62-112, 54-35, 4728, 30-86, 18-54	Ib1 / n=21
I-367, I-9, 1255, 1192, 1190, 81-1, 53-78, 48-29, I CO	Ib2 / n=9
I-361, I-19	IIb1 / n=2
Филогенетическая группа A.Br.Aust94, n=7 Phylogenetic group A.Br.Aust94, n=7	
73-42, 71-171, 28-83	Ib1 / n=3
1168, 1183, 377-3, 266-65D	Ib2 / n=4
Филогенетическая группа A.Br.001/002, n=2 Phylogenetic group A.Br.001/002, n=2	
I-45	Ia1 / n=1
Sterne_34F2	Ia2 / n=1
Филогенетическая группа A.Br.Ames, n=5 Phylogenetic group A.Br.Ames, n=5	
I-35, I-319, I-370, I-357	Ia1 / n=4
I-360	IIb1 / n=1
Филогенетическая группа B.Br.001/002, n=18 Phylogenetic group B.Br.001/002, n=18	
1339-24, 1340-26, 1342-12, 1344-23, 1345-27, 1346-29, 1337-5875	IIa / n=7
1335, I-29, I-271, 1368, 1369	IIb1 / n=5
1051-35, 1336, I-368, 1370	IIb2 / n=4
I-373, I-362	Ia1 / n=2

и Кабардино-Балкарской Республики (1967–1998, 1994 гг.). Наименее представительной в нашей выборке была группа A.Br.001/002, которая насчитывала два штамма возбудителя: I-45, выделенный на территории Республики Тыва в 1966 г., и вакцинный штамм Sterne 34F2. Главную генетическую линию В (В.Br.001/002) на представленной дендрограмме образовали 18 штаммов, выделенные на территории Республики Саха (Якутия), Алтайского края, ЯНАО, республик Тыва, Башкортостан и Бурятия с 1953 по 2018 г.

Оптимизация этапа предварительной обработки масс-спектрометрических данных. Биоинформационная обработка белковых профилей с помощью пакетов MALDIquant, MALDIrra заключалась в преобразовании шкалы интенсивности a.i., сглаживании (метод Savitzky – Golay) и коррекции базовой линии, нормализации интенсивности каждого пика. Реализованный в работе подход позволил совместить этап выявления истинных максимумов на спектрах с удалением шума, что более эффективно по сравнению с применением аналогичных алгоритмов. Использование пакетов MALDIquant, MALDIrra позволило обнаружить до 180 пиков на масс-спектрах, тогда как с помощью алгоритма MassSpecWavelet было выявлено не более 100 пиков для единичного спектра. Выравнивание реплик каждого образца относительно оси абсцисс проводили суперсглаживающим методом, что позволило исключить пики с частотой встречаемости менее 25 %. Уточнение m/Z значений гомологичных сигналов осуществляли на основании пяти реплик каждого образца. При построении дендрограммы использовали преобразованные «суммарные» белковые профили (рисунок). Воспроизводимость данных оценивали с помощью критериев: разрешение пиков, соотношение сигнал/шум, количество пиков, их интенсивность.

Результаты анализа штаммов *B. anthracis* с помощью MALDI-TOF MS. Внутривидовую дифференциацию штаммов *B. anthracis* проводили на основании масс-спектрометрии клеточных белков микроорганизма – продуктов трансляции генов. Для поиска штаммовых особенностей внутри группы *B. anthracis* были собраны MALDI-TOF MS спектры представителей двух основных канонических групп А и В возбудителя сибирской язвы. Как и ожидалось, все принадлежащие к 5 генотипам штаммы *B. anthracis* (табл. 2) на дендрограмме, построенной по результатам кластерного анализа белковых профилей, образовали две группы – I и II (рисунок). Ветвь I делилась на кластеры Ia (подкластеры Ia1, Ia2) и Ib (подкластеры Ib1, Ib2), ветвь II содержала кластеры IIa и IIb (подкластеры IIb1 и IIb2). Субкластеры в последующем разделялись на отдельные ветви более низкого уровня. Всего в ветви I выделялись 21 группа с двумя штаммами в каждом из них, а также 14 ветвей для индивидуальных штаммов. Для филогенетической ветки II таких групп было 6 и 8 соответственно.

Более половины всех пиков (до 60 %) являлись общими для всей совокупности масс-спектров. Выявлено 7 общих сигналов на масс-спектрах представителей ветви I (100 %) в диапазоне масс 2,8–6,4 кДа, основной массив (99 %) белковых профилей содержал 34 пика в интервале 2,3–9,7 кДа [5, 14]. Спектры представителей ветви II насчитывали 7 сигналов в диапазоне m/Z 2,8–6,3 кДа. Среди штаммов, выделенных при вспышке сибирской язвы на Ямале в 2016 г. (1339-24, 1340-26, 1342-12, 1344-23, 1345-27, 1346-29), и изолятов 1051/35 и 1335 пики, общие для остальных штаммов (34 пика в интервале 2,3–9,7 кДа), отсутствовали.

Группа общих сигналов также определена и для масс-спектров штаммов, расположенных в кластерах IIb и Ia. Вероятно, выявленные сигналы могут быть использованы как биомаркеры для каждой из групп, а времяпролетная масс-спектрометрия – как дополнительный типизирующий метод для дискриминации изолятов, имеющих близкие MALDI-TOF MS профили, в частности, при дифференциации отдельных бактериальных изолятов возбудителя сибирской язвы на внутривидовые группы.

Отдельные кластеры Ia и Ib ветви I вошли штаммы, изолированные на территории Сибири и Дальнего Востока, которые по результатам филогенетического анализа на основании canSNP-генотипирования принадлежат к группам A.Br.008/009, A.Br.Ames, A.Br.0001/002 и A.Br.Aust94. В частности, на филопротеомной дендрограмме, представленной на рисунке, кластер Ia включает два субкластера: Ia1 и Ia2. В субкластер Ia1 вошли штаммы основной генетической клады А, в том числе 4 штамма группы A.Br.Ames (I-35, I-357, I-370, I-319), 5 штаммов группы A.Br.008/009 (I-356, I-323, I-63, I-217, I-275) и 1 штамм группы A.Br.0001/002 (I-45). Исключение составили два штамма I-373 и I-362, изолированные в Алтайском крае и Республике Бурятия, для которых установлена принадлежность к генетической линии В (группа В.Br.001/002). В состав субкластера Ia2 кластера Ia вошли все 5 вакцинных штаммов основной генетической линии А: 4 штамма группы A.Br.008/009 (СТИ-IP, СТИ-1, 55-ВНИИВиМ, 71/12) и 1 штамм группы A.Br.001/002 (Sterne 34F2). Эти штаммы не продуцируют ряд белков, кодируемых плазмидой pX02.

Наибольшее количество штаммов основной генетической линии А по данным MS представлено в составе субкластеров Ib1 и Ib2 кластера Ib. В частности, в субкластер Ib1 вошли 21 штамм, принадлежащие к canSNP-группе A.Br.008/009, и 3 штамма группы A.Br.Aust94 (28/83, 71-171, 28-83). Субкластер Ib2 насчитывал 13 изолятов, из которых 9 штаммов отнесены к группе A.Br.008/009 и 4 штамма – к группе A.Br.Aust94 (1183, 377/3, 1168, 266/65D). Кроме того, для штаммов *B. anthracis* 1183, 1255, 1190, 1192 был установлен общий сигнал (Да): 2766,9. Всего из 37 изолятов *B. anthracis* кластера Ib 30 принадлежали к canSNP-группе

A.Br.008/009, остальные 7 входили в группу A.Br.Aust94.

Штаммы группы V.Br.002 вошли в ветвь II, которая представлена двумя кластерами – IIa и IIb. Штаммы, выделенные от людей, оленей и объектов окружающей среды в 2016 г. на Ямале, на дендрограмме вошли в состав самостоятельного кластера IIa, что в полной мере согласуется с данными об общности их происхождения. Кластер IIb представлен двумя отдельными субкластерами: IIb1, в который вошли штаммы филогенетической линии V.Br.001/002: 1335, 1368, 1369, I-29, I-271, A.Br.008/009: I-19, I-361, A.Br.Ames: I-360, – и IIb2 – штаммы филогенетической группы V.Br.001/002: 1051-35, 1336, I-368, 1370.

Несоответствие между кластеризацией методами canSNP-типирования и MALDI-TOF MS наблюдалось для 5 штаммов: I-360, с одной стороны, принадлежал к филогенетической группе A.Br.Ames, а с другой – по масс-спектрометрическому анализу – к группе IIb1; I-19, I-361 – A.Br.008/009 и IIb1; I-373, I-362 – V.Br.001/002 и Ia1 соответственно.

Вероятно, указанные штаммы отличаются характером экспрессии белков, что не отражается на результатах canSNP-типирования, но влияет на результаты белкового профилирования.

Сравнение результатов canSNP-генотипирования и MALDI-TOF MS. Исходя из рассчитанных значений индексов дискриминации для схемы canSNP-генотипирования (0,643) и белкового профилирования (0,952) исследуемой выборки штаммов, можно говорить о более высокой дифференцирующей способности используемого метода времяпролетной масс-спектрометрии. По этому показателю метод MALDI-TOF-типирования приближается к MLVA31 с индексом дискриминации 0,988 [3].

В ходе сравнительного анализа результатов филогенетической реконструкции штаммов возбудителя сибирской язвы с использованием белкового профилирования и canSNP-генотипирования выделено в популяции штаммов, принадлежащих к группе V.Br.001/002, более трех подтипов MALDI масс-профилей (протеотипов) штаммов возбудителя сибирской язвы (рисунок). Среди штаммов генетической линии A, представленной в данной работе 4 генотипами, определено более 10 протеотипов возбудителя (табл. 3).

Принимая во внимание полученную информацию, можно говорить о том, что результаты исследования возбудителя сибирской язвы методом времяпролетной масс-спектрометрии согласуются с данными canSNP-генотипирования в отношении разделения на две главные генетические линии A и B.

В частности, положительная корреляционная связь установлена для 70 штаммов (95,9 %), исключение составили 3 изолята (4,1 %). Кроме того, построенная по результатам времяпролетной масс-спектрометрии кластеризация позволила выделить штаммы *B. anthracis*, принадлежа-

щие к одной вспышке, в самостоятельную ветвь (на дендрограмме IIa), что обусловлено общностью их происхождения. Выявлено, что штаммы I-373 и I-362 (V.Br.001/002) на основании данных времяпролетной масс-спектрометрии находились в субкластере Ia1 со штаммами групп A.Br.008/009 и A.Br.001/002, и, напротив, штаммы I-360, I-19 и I-361 (A.Br.Ames и A.Br.008/009) располагались в субкластере IIb1 со штаммами V.Br.001/002. Выявленное несоответствие результатов кластеризации отдельных штаммов на основании результатов canSNP-генотипирования и времяпролетной масс-спектрометрии может быть следствием штаммовых отличий характера экспрессии белков, что не выявляется методами canSNP-типирования, но подтверждается результатами белкового профилирования.

Исходя из полученных данных и принципиальных возможностей метода, следует отметить, что canSNP13-генотипирование позволяет установить принадлежность штамма к определенным основным генетическим линиям глобальной структуры популяции *B. anthracis* и каноническим группам, но не позволяет провести дифференциацию штаммов, входящих в одну каноническую группу. Такая дифференциация осуществима при использовании MLVA31 или анализа SNP корового генома на основе полногеномного секвенирования. Сравнивая кластеры, полученные на основании данных canSNP-генотипирования и белкового профилирования, необходимо иметь в виду, что указанные подходы используют разные объекты для исследования. В частности, canSNP-генотипирование позволяет провести классификацию бактерий на основе анализа консервативного базового набора из 13 однонуклеотидных полиморфизмов, из которых 3 приходятся на межгенные области, остальные присутствуют в генах белков так называемого «домашнего хозяйства». Очевидно, что молекулярные массы белков, SNP в генах которых анализируются при canSNP-генотипировании, за исключением одного, составляют от 32 до 70 кДа и поэтому не могут определяться в используемом варианте масс-спектрометрии с диапазоном измеряемых масс 2–20 кДа. Следовательно, полная корреляция результатов canSNP-генотипирования и белкового профилирования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии невозможна.

Результаты исследования подтверждают возможность эффективного использования для рутинного молекулярного протеотипирования изолятов сибирской язвы метода MALDI-TOF MS, обладающего такими преимуществами, как высокая производительность в сочетании с относительно низкой трудоемкостью. Реализация метода MALDI-TOF MS протеотипирования достигается при использовании биоинформационного подхода в среде языка статистического программирования R. Подтверждено, что предлагаемый подход для дифференциации протеотипов штаммов *B. anthracis* с индексом дискриминации 0,952 превышает таковой для мето-

да canSNP-типирования и сопоставим с индексом дискриминации для метода MLVA31. Корреляция результатов кластеризации штаммов при типировании методами MALDI-TOF масс-спектрометрии и canSNP-генотипирования достигает 95 % в отношении разделения на главные генетические линии А и В. Для штаммов основной генетической линии А, представленной в данной работе 4 canSNP-генотипами, определено более 10 прототипов возбудителя, что, вероятно, может быть связано с разными анализируемыми показателями и характером экспрессии белков у разных штаммов.

MALDI-TOF масс-спектрометрия позволяет получить сопоставимые с генетическими тестами результаты, имеет лучшую дискриминирующую способность по сравнению с canSNP-типированием. Может применяться наряду с методом MLVA31 при оперативном эпидемиологическом анализе.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

- Shadomy S., El Idrissi A., Raizman E., Bruni M., Palamara E., Pittiglio C., Lubroth J. Anthrax outbreaks: a warning for improved prevention, control and heightened awareness. *Empres Watch*. 2016; Vol. 37. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.fao.org/3/a-i6124e.pdf> (дата обращения 09.11.2020).
- Попова А.Ю., Демина Ю.В., Ежлова Е.Б., Куличенко А.Н., Рязанова А.Г., Малеев В.В., Плоскирева А.А., Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Нечепуренко Л.А., Харьков В.В. Вспышка сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 году, эпидемиологические особенности. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 4:42–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-42-46.
- Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Ковалев Д.А., Головинская Т.М., Чмеренко Д.К., Куличенко А.Н. Сравнительный анализ методов генетического типирования *Bacillus anthracis*. *Генетика*. 2019; 55(1):40–51. DOI: 10.1134/S0016675819010065.
- Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy C., Colaneri C., Vergnaud G., Madani N. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. *PLoS One*. 2014; 9(6):e95131. DOI: 10.1371/journal.pone.0095131.
- Lasch P., Jacob D., Grunow R., Schwecke T., Doellinger J. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of highly pathogenic bacteria. *TrAC – Trends Anal. Chem.* 2016; 85(Pt. 1):103–11. DOI: 10.1016/j.trac.2016.04.013.
- Teramoto K., Okubo T., Yamada Y., Sekiya S., Iwamoto S., Tanaka K. Classification of Cutibacterium acnes at phylotype level by MALDI-MS proteotyping. *Proc. Jpn Acad., Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2019; 95(10):612–23. DOI: 10.2183/pjab.95.042.
- Афанасьев М.В., Кравец Е.В., Такайшвили В.Е., Дугаржапова З.Ф., Балахонов С.В. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis*, циркулирующих на территории Сибири и Дальнего Востока. В кн.: Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: Материалы VI Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (22–24 октября 2014 г., Ставрополь). Ставрополь: Экспо-Медиа; 2014. С. 53–4.
- Wei J., Zhang H., Zhang H., Zhang H., Zhang B., Zhao F., Xiao D. Novel strategy for rapidly and safely distinguishing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* by use of peptide mass fingerprints based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 59(1):e02358-20. DOI: 10.1128/JCM.02358-20.
- Takahashi N., Nagai S., Fujita A., Ido Y., Kato K., Saito A., Moriya Y., Tomimatsu Y., Kaneta N., Tsujimoto Y., Tamura H. Discrimination of psychrotolerant *Bacillus cereus* group based on MALDI-TOF MS analysis of ribosomal subunit proteins. *Food Microbiol.* 2020; 91:103542. DOI: 10.1016/j.fm.2020.103542.

MALDI-TOF MS analysis of ribosomal subunit proteins. *Food Microbiol.* 2020; 91:103542. DOI: 10.1016/j.fm.2020.103542.

10. Gibb S., Strimmer K. Mass spectrometry analysis using MALDIquant. In: Datta S., Mertens B., editors. *Statistical Analysis of Proteomics, Metabolomics, and Lipidomics Data Using Mass Spectrometry*. Springer International Publishing; 2017. P. 101–24. DOI: 10.1007/978-3-319-45809-0_6.

11. Ульшина Д.В., Еременко Е.И., Ковалев Д.А., Рязанова А.Г., Кузнецова И.В., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Бобрышева О.В., Сирица Ю.В., Куличенко А.Н. Выявление особенностей масс-спектров белковых экстрактов споровой и вегетативной форм возбудителя сибирской язвы методом времяпролетной масс-спектрометрии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 6:66–72. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-6-66-72.

12. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M., Kachur S.M., Leadem-Dougherty R.R., Rhoton S.D., Zinser G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2007; 2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461.

13. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11):2465–6. DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.

14. Dybwad M., van der Laaken A.L., Blatny J.M., Paauf A. Rapid identification of *Bacillus anthracis* spores in suspicious powder samples by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(17):5372–83. DOI: 10.1128/AEM.01724-13.

References

- Shadomy S., El Idrissi A., Raizman E., Bruni M., Palamara E., Pittiglio C., Lubroth J. Anthrax outbreaks: a warning for improved prevention, control and heightened awareness. *Empres Watch*. 2016; Vol. 37. (Cited 09 Nov 2020). [Internet]. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i6124e.pdf>.
- Popova A.Yu., Demina Yu.V., Ezhlova E.B., Kulichenko A.N., Ryzanova A.G., Maleev V.V., Ploskireva A.A., Dyatlov I.A., Timofeev V.S., Nepochurenko L.A., Khar'kov V.V. [Outbreak of anthrax in the Yamalo-Nenets Autonomous District in 2016, epidemiological peculiarities]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (4):42–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-42-46.
- Eremenko E.I., Ryzanova A.G., Pisarenko S.V., Aksеноva L.Yu., Semenova O.V., Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Kovalev D.A., Golovinskaya T.M., Chmerenko D.K., Kulichenko A.N. [Comparative analysis of genotyping methods for *Bacillus anthracis*]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2019; 55(1):40–51. DOI: 10.1134/S0016675819010065.
- Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy C., Colaneri C., Vergnaud G., Madani N. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. *PLoS One*. 2014; 9(6):e95131. DOI: 10.1371/journal.pone.0095131.
- Lasch P., Jacob D., Grunow R., Schwecke T., Doellinger J. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of highly pathogenic bacteria. *TrAC – Trends Anal. Chem.* 2016; 85(Pt. 1):103–11. DOI: 10.1016/j.trac.2016.04.013.
- Teramoto K., Okubo T., Yamada Y., Sekiya S., Iwamoto S., Tanaka K. Classification of Cutibacterium acnes at phylotype level by MALDI-MS proteotyping. *Proc. Jpn Acad., Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2019; 95(10):612–23. DOI: 10.2183/pjab.95.042.
- Afanasyev M.V., Kravets E.V., Takayshvili V.E., Dugarzhapova Z.F., Balakhonov S.V. [Molecular-genetic characteristics of *Bacillus anthracis* strains circulating in Siberia and the Far East]. In: [Topical Issues of Epidemiology and Preventive Medicine: Proceedings of the VI All-Russian Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Specialists of the Rospotrebnadzor (22–24 Oct. 2014, Stavropol)]. Stavropol: Expo-Media; 2014. P. 53–4.
- Wei J., Zhang H., Zhang H., Zhang H., Zhang B., Zhao F., Xiao D. Novel strategy for rapidly and safely distinguishing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* by use of peptide mass fingerprints based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 59(1):e02358-20. DOI: 10.1128/JCM.02358-20.
- Takahashi N., Nagai S., Fujita A., Ido Y., Kato K., Saito A., Moriya Y., Tomimatsu Y., Kaneta N., Tsujimoto Y., Tamura H. Discrimination of psychrotolerant *Bacillus cereus* group based on MALDI-TOF MS analysis of ribosomal subunit proteins. *Food Microbiol.* 2020; 91:103542. DOI: 10.1016/j.fm.2020.103542.
- Gibb S., Strimmer K. Mass spectrometry analysis using MALDIquant. In: Datta S., Mertens B., editors. *Statistical Analysis*

of Proteomics, Metabolomics, and Lipidomics Data Using Mass Spectrometry. Springer International Publishing; 2017. P. 101–24. DOI: 10.1007/978-3-319-45809-0_6.

11. Ulshina D.V., Eremenko E.I., Kovalev D.A., Ryazanova A.G., Kuznetsova I.V., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Bobrysheva O.V., Siritsa Yu.V., Kulichenko A.N. [Study of the mass-spectra' features of spores and vegetative forms of *Bacillus anthracis* using time of flight mass-spectrometry]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2018; (6):66–72. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-6-66-72.

12. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M., Kachur S.M., Leadem-Dougherty R.R., Rhoton S.D., Zinser G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2007; 2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461.

13. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11):2465–6. DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.

14. Dybwad M., van der Laaken A.L., Blatny J.M., Paauw A. Rapid identification of *Bacillus anthracis* spores in suspicious powder samples by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(17):5372–83. DOI: 10.1128/AEM.01724-13.

Authors:

Ulshina D.V., Kovalev D.A., Eremenko E.I., Semenova O.V., Ryazanova A.G., Bobrysheva O.V., Zhirov A.M., Kulichenko A.N. Stavropol' Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Об авторах:

Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Еременко Е.И., Семенова О.В., Рязанова А.Г., Бобрышева О.В., Жиров А.М., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.