



Н.Р. Телесманич, В.В. Агафонова, И.А. Чайка, С.О. Сеина, О.С. Чемисова,
Е.В. Гончаренко, Е.А. Меньшикова, М.В. Полеева

MALDI MASS-SPECTROMETRIC ANALYSIS IN TYPING AND INTRASPECIES DIFFERENTIATION OF CHOLERA VIBRIOS ON THE BASIS OF CONSTRUCTION OF THE REFERENCE LIBRARY OF PROTEOMIC PROFILES

*Ростовский-на-Дону противочумный институт,
лаборатория экологии холеры*

Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru

Цель: создание персональной релевантной базы данных спектров *V.cholerae* разных биоваров, серологических групп и токсигенности, которая позволит идентифицировать, дифференцировать и сравнивать микробные изоляты на основе анализа фингерпринтов рибосомальных белковых клеток холерных вибрионов.

Материалы и методы: для создания системы референс-библиотеки масс-зарядов m/z были использованы 100 паспортизированных музейных штаммов, охарактеризованных по комплексу показателей: принадлежность к серогруппе, биовару, объекту и году выделения, наличие генов холерного токсина (ctxAB+).

Результаты: Проведённые исследования позволили создать персональную базу данных расширенной коллекции белковых спектров холерных вибрионов в дополнение к MALDI Biotyper («Bruker Daltonics») (свидетельство о государственной регистрации базы данных «Белковые профили масс-спектров представителей вида *V.cholerae* для программы MALDI Biotyper» № 2013620585 от 29.04.2013 г.).

Заключение: созданная релевантная база данных белковых спектров позволяет проводить видовую и частично внутривидовую дифференциацию *V.cholerae* O1 и O139 на основе анализа фингерпринтов рибосомальных белков клеток холерных вибрионов.

Ключевые слова: холерные вибрионы, масс-спектрометрический анализ, база данных белковых профилей холерных вибрионов.

N.R. Telesmanich, V.V. Agafonova, I.A. Chaika, S.O. Seina, O.S. Chemisova,
Ye.V. Goncharenko, E.A. Menshikova, M.V. Poleeva

MALDI MASS-SPECTROMETRIC ANALYSIS FOR TYPING AND INTRASPECIES DIFFERENTIATION OF CHOLERA VIBRIOS ON THE BASE OF CONSTRUCTION OF THE REFERENCE LIBRARY OF PROTEOMIC PROFILES

Control Plague Research Institute

117 Gorky st., Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aanet.ru

Purpose: Construction of a personal relevant database on spectra of *V. cholerae* strains belonging to different biotypes, serological groups and toxigenic levels, which will allow for the identification, differentiation and comparison of bacterial isolates on the base of analysis of *V. cholerae* ribosomal protein cell fingerprints.

Materials and methods: For the construction of the reference library of mass charges m/z 100 passportized strains from museum collection have been used, characterized by the complex of parameters, namely: by serogroup, biotype, object and year of isolation and by the presence of cholera toxin genes (ctxAB+).

Results: As the result of the studies performed the personal database has been developed for the expanded collection of *Vibrio cholerae* protein spectra in addition to MALDI Biotyper («Bruker Daltonics») (Certificate of State Registration for database «Proteomic Profiles of Mass-Spectra of Strains Representing *V. cholerae* Species for MALDI Biotyper Program» No. 2013620585 of 29.04.2013).

Summary: The relevant protein spectra database developed provides the possibility to perform interspecies and partial intraspecies differentiation of *V. cholerae* O1 and O139 strains on the base of analysis of fingerprints of *V. cholerae* ribosomal protein cells.

Keywords: cholera vibrios, mass-spectrometric analysis, *V. cholerae* proteomic profile database.



Введение

Одним из направлений молекулярной диагностики, развивающимся в настоящее время в России и за рубежом, является масс-спектрометрический анализ. Масс-спектрометрирование направлено на решение основной задачи – белковое профилирование. Белковое профилирование – это метод прямого масс-спектрометрического анализа белковой фракции биологического объекта, позволяющий получать уникальные для каждого изучаемого объекта масс-спектры. Большое количество результирующих пиков на масс-спектре является репрезентативной фенотипической характеристикой как отдельных белков, биологических жидкостей, тканей, так и микроорганизмов. Выявление специфичных для конкретного вида микроорганизма спектров константных рибосомальных белков клетки за счет осуществления прямого белкового профилирования дает возможность констатировать и анализировать уникальные для изучаемого объекта, рода и вида, группы биомаркеры, являющиеся по существу «отпечатками пальцев», и расширяет возможности идентификации микроорганизмов [1-8].

Метод времяпролетной масс-спектрометрии MALDI TOF – это один из видов масс-спектрометрического анализа, используемый для характеристики микроорганизмов, рассматривается в качестве альтернативного подхода комплексу традиционных методов идентификации. MALDI TOF MS основана на разделении ионов разных масс в вакууме под действием электрических и магнитных полей. Реализация этого принципа осуществляется за счет матрично-активированной лазерной десорбции изучаемого вещества в комплексе с времяпролетным анализатором (TOF), в котором частицы разной массы (заряда) (m/z) разделяются по времени пролета определенного расстояния до детектора, считывающего электрические сигналы, лежащие в основе построения спектров. Вся необходимая информация для идентификации микробов представляется на графике пиков, сопровождаемых значением m/z (отношения массы к заряду в ионизированном состоянии и уровней интенсивности). Идентификация микроорганизмов методом MALDI TOF MS проводится с помощью базы данных MALDI Biotyper («Bruker»), содержащей референтные белковые профили 5000 видов микроорганизмов.

Однако оптимальная процедура прямого белкового профилирования и биотипирования применительно к возбудителям особо опасных инфекций до настоящего времени не определена. Отмечено, что внесение в коммерческую базу нескольких представителей *V. cholerae* позволяет проводить идентификацию возбудителей холеры [9]. Вид *V. cholerae* обладает достаточно широким фенотипическим и генотипическим разнообразием, что диктует необходимость изучения закономерностей синтеза константных рибосомальных белков у представителей внутри вида на репрезентативной коллекции штаммов. Научные данные о возможностях внутривидовой дифференциации *V. cholerae* с помощью масс-спектрометрического анализа и существования расширенной библиотеки масс-спектров холерных вибрионов в литературе отсутствуют.

Создание расширенной библиотеки спектров коллекции холерных вибрионов позволит проводить не только идентификацию *V. cholerae*, но и расширить возможности дифференциации внутри вида. Основным преимуществом программы MALDI Biotyper («Bruker Daltonics») является возможность пополнения персональной базы новыми спектрами и подключение к MALDI Biotyper – программе для обработки и анализа масс-спектров, которая в последующем будет основана на сравнении полученных профилей с персональной библиотекой референтных спектров. В процессе идентификации сравниваются такие параметры, как положение пиков, их частота, интенсивность.

В связи с чем целью нашего исследования явилось создание персональной релевантной базы данных спектров *V. cholerae* разных биоваров, серологических групп и токсигенности, которая позволит идентифицировать, дифференцировать и сравнивать микробные изоляты на основе анализа фингерпринтов рибосомальных белковых клеток холерных вибрионов.

Материалы и методы

Для создания системы референс-библиотеки масс-зарядов m/z были использованы 100 паспортизированных музейных штаммов, охарактеризованных по комплексу показателей: принадлежность к серогруппе, биовару, объекту и году выделения, наличие генов холерного токсина (*ctxAB+*). Эти данные также были заложены в создаваемую базу данных масс-спектров. Персональная база должна быть создана на основе типичных штаммов, охватывающих более 90% внутривидового разнообразия. Выявлено, что точность идентификации значительно зависит от релевантности (смысловым соответствием между информационным запросом и полученным сообщением) базы данных и выбора референс-изолятов. Это является особенно важным для видов с широким генетическим и фенотипическим разнообразием, что характерно для вида *V. cholerae*. В качестве референтных штаммов для создания суперспектров были использованы штаммы: *V. cholerae* eltor – *ctxAB+* – 25, *V. cholerae* eltor – *ctxAB* – 24, *V. cholerae* classical – *ctxAB+* – 2, *V. cholerae* O139 – *ctxAB+* – 5, *V. cholerae* O139 – *ctxAB* – 4, а также *V. cholerae* O1/не O139 *ctxAB+* – 20, *V. cholerae* O1/не O139 *ctxAB* – 20. Подготовка материала для создания библиотек спектров проводилась с учетом требований биологической безопасности. Все образцы проводили через процедуру экстракции трифторуксусной кислотой (80% TFA) для создания репрезентативных спектров, а также с целью обеззараживания культур холерных вибрионов. Экстракцию проводили в 50 мкл 80% трифторуксусной кислоты (TFA), куда бактериологической петлей вносили 10 колоний образца для получения достаточного количества рибосомальных белков. Смесь оставляли на 30 мин. при комнатной температуре; добавляли 150 мкл бидистиллированной воды и 200 мкл ацетонитрила. Смесь встряхивали на вортексе, центрифугировали (12000-13000 об/мин) – 2 минуты. Полученный супернатант проверяли на жизнеспособность при помощи высевов на специфическую стерильность. Определено, что после проведенных этапов экстракции белков рост холерных вибрионов не наблюдался. Супернатант в количестве 0,5 мкл размещали на ячейке MSP-чипа, и после полного высыхания наслаивали 0,5 мкл раствора матрицы (α -циано – 4 гидроксикоричная кислота в 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). В программе Flex control проводили обстрел в ручном режиме, снимали спектры и проводили анализ. Контроль составленной базы проводили на всех гомологичных штаммах, внесенных в базу, и коллекции штаммов, которые в базу не были внесены. С созданной базой степень достоверных



совпадений оценивали по показателям Score; в диапазоне от 0 до 3: значения - 2.300-3.00 (цвет зеленый) - указывает на высокую вероятность идентификации вида; значения - 2.000-2.299 - надежная идентификация рода и возможная идентификация вида; значения - 1.700 - 1.999 - возможная идентификация рода, менее - 1.700 - невозможно идентифицировать.

Результаты и обсуждение

Идентификация бактерий с использованием масс-спектрометрии MALDI TOF представляет собой альтернативу традиционным лабораторным методам. Необходимым условием является построение высококачественных библиотек спектров для решения конкретной задачи. Применение программы Biotyper («Bruker Daltonics») позволяет проводить идентификацию 5000 видов микроорганизмов, включая мицелиальные грибы, дрожжи, Грам-отрицательные и Грам-положительные бактерии, в том числе белковые профили представителей рода *Vibrio* (*Vibrio agarivoronas*, *Vibrio algenalyticus*, *Vibrio brasiliensis*, *Vibrio campbelli*, *Vibrio albensis* и др. всего 47 видов).

Несмотря на то, что база данных «Bruker» не содержит профилей холерных вибрионов, определенный опыт идентификации при помощи коммерческой базы Biotyper был получен нами при мониторинге судовых балластных вод международного морского транспорта в бассейне Азовского моря в 2012 году. Проведенное белковое профилирование культур (более 600 штаммов), выделенных при исследовании проб (350 проб), позволило идентифицировать представителей 13 видов рода *Vibrio*, при этом 31 штамм был позиционирован как *Vibrio albensis*. В соответствии с современной таксономией (Bergeys, 2005 г.) биOLUMИнесцирующая бактерия *Vibrio albensis* отнесена к *V.cholerae* биовар *albensis*. Проведенное бактериологическое исследование подозрительных культур в соответствии со схемой лабораторной диагностики холеры подтвердило принадлежность штаммов *V. albensis* к холерным вибрионам неагглютинирующимся O1-холерной сывороткой *V.cholerae* не O1/ не O139 [10]. При масс-спектрометрическом анализе паспортизированные музейные штаммы *V.cholerae* eltor с заведомо известной характеристикой были так же идентифицированы Biotyper как *V. albensis*, не позволяя получить информацию о наличии в исследуемой пробе возбудителя холеры. Однако, как выявлено, ориентировка на профиль *V. albensis* способствует идентификации холерных вибрионов на этапе отбора подозрительных на *V. cholerae* колоний.

Для создания персональной базы данных холерных вибрионов использовали охарактеризованные музейные штаммы. В программе Flex control проводили обстрел в ручном режиме, снимали 40 спектров с каждой ячейки с образцом. С помощью программы MALDI Biotyper 3.0 открывали сохраненные спектры. Образцам (паттернам), полученным при белковом профилировании штаммов, присваивали номер и паспортные данные, характеризующие вид, биовар, серологическую группу, наличие генов токсинообразования, объект и год выделения. В итоге созданная нами персональная база данных холерных вибрионов, имеющая на сегодняшний день библиотеку профилей 100 штаммов, представляет собой репрезентативную коллекцию масс-спектров, позволяющих анализировать сходства и отличия представителей *Vibrio cholerae* на основании таксон-специфических белковых

паттернов, характерных для биоваров, серологических групп и токсигенных вариантов. Суммарные спектры позволяют анализировать сходства и отличия типичных представителей *Vibrio cholerae*. Основные спектры лежат в основе индексирования коэффициента совпадений Score при профилировании неизвестного микроорганизма, которые вычисляются на основе количества совпавших пиков, их интенсивности, степени совпадений масс-спектров (полное/неполное).

В отличие от базы данных Bruker в нашей базе содержится информация о коллекции спектров *V.cholerae*. При идентификации подозрительной на *V.cholerae* колонии (культуры) возможно использование двух баз данных – коммерческой (при ориентации на род *Vibrio*) и персональной на вид *V.cholerae* и групп внутри вида.

Масс-спектр, состоящий из пиков разной интенсивности, является графическим отображением масс-пика листа (MSP Peak List), который представляет собой таблицу всех молекулярных масс полученных профилей каждого штамма. Данное отличие позволяет проводить частичную видовую дифференциацию и с высоким показанием Score идентифицировать *V.cholerae* O1. Анализ масс-пик листов белковых спектров *V.cholerae* позволил выявить существенные отличия между интенсивностью пиков *V.cholerae* eltor и *V.cholerae* не O1/ не O139. Нами установлено, что большинство представителей O1 серогруппы имеют 5 пиков с индексом интенсивности (количество белков с конкретными молекулярными массами) (50-100%), в диапазоне молекулярных масс 4.000, 4.400, 5000, 6000, 7000 Да, в то время как *V.cholerae* не O1/ не O139 - один, два пика с интенсивностью (70-100%) с м.м 4.000, 4.300 Да. MSP-лист позволяет объективно оценить и охарактеризовать в цифровых параметрах количественное содержание фракций рибосомальных белков штаммов разного происхождения и вирулентности. На основе спектров персональной базы получены дендрограммы, позволяющие проводить молекулярное типирование штаммов, выделенных в разные годы, и на разных территориях устанавливать степень филогенетического родства и происхождения свежесделанных изолятов.

Контроль коллекции спектров на основе гомологичных и гетерологичных образцов показал, что каждый штамм коллекции *V.cholerae* eltor был идентифицирован с высоким показателем Score (2-3), отражая вид, биовар, O1 серогруппу в 100% случаях, в то время как токсигенность определялась только в 60% совпадений, что делает необходимым подтверждение наличия гена холерного токсина с помощью классического подхода ПЦР-диагностики. В то время как контроль коллекции представителей вида *Vibrio cholerae* O139 демонстрировал 100% принадлежность к серогруппе O139, 100% совпадений при определении токсигенных и атоксигенных вариантов с высоким показателем Score (2-3).

Заключение

Проведенные исследования позволили создать персональную базу данных расширенной коллекции белковых спектров холерных вибрионов в дополнение к MALDI Biotyper («Bruker Daltonics»), позволяющую проводить видовую и частично внутривидовую дифференциацию *V.cholerae* (свидетельство о государственной регистрации базы данных «Белковые профили масс-спектров представителей вида *V.cholerae* для программы MALDI Biotyper» № 2013620585 от 29.04.2013 г.). В дальнейшем



необходимо продолжение исследований, направленных на изучение диагностических возможностей масс-спектрометрического анализа для перспектив внутривидовой дифференциации, выявления и характеристики

атипичных штаммов, а также для пополнения аналитической коллекции масс-спектров представителей вида *Vibrio cholerae*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кубанова А.А., Говорун В.М., Ильина Е.Н., Верещагин В.А., Фриго Н.В., Припутневич Т.В. Первый опыт применения метода прямого белкового профилирования для идентификации и типирования *N. gonorrhoeae* // Вестник дерматологии и венерологии. – 2006. – № 5. – С. 25-29.
2. Маянский Н.А., Калакуцкая А.Н., Мотузова О.В., Ломинадзе Г.Г., Крыжановская О.А., Катосова Л.К. MALDI-TOF масс-спектрометрия в рутинной работе микробиологической лаборатории // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2011. – Т. 3, № 5. – С. 20-25.
3. Benagli C., Demarta A., Caminada A.P., Ziegler D., Petrini O., Tonolla M. A Rapid MALDI-TOF MS Identification Database at Genospecies Level for Clinical and Environmental *Aeromonas* S trains// PLoS ONE. – 2012. – 7(10): e48441. doi:10.1371/journal.pone.0048441
4. Dieckmann R., Helmuth R., Erhard M., Malorny B. Rapid classification and identification of *Salmonellae* at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry// Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74. – P. 7767-7778.
5. Dieckmann R., Strauch e., Alter t. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry// j. Appl. Microbiol. – 2010. – vol. 109, № 1. – p. 199-211.
6. Hazen T.H., Martinez R.J., Chen Y., Iafon P.C., Garrett N.M., Parsons M.B., Bopp C.A., Sullards M.C., Sobczyk P.A. Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry// appl. Environ. Microbiol. – 2009. – vol. 75(21). – p. 6745-6756.
7. Welker M., Moore E.R. Applications of whole-cell matrix-assisted laserdesorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology// Syst. Appl. Microbiol. – 2011. – Vol. 34. – P. 2-11.
8. Williamson Y. M., Moura H., Woolfitt A. R., Pirkle J. L., Barr J. R., Carvalho M. D. G., Ades E. P., Carlone G. M., Sampson J. S. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* conjunctivitis outbreak isolates by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry// Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74. – P. 5891-5897.
9. Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Остяз А.С., Басов Е.А., Куликалова Е.С., Хинхива Ж.Ю., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В., «MALDI TOF - масс-спектрометрический анализ в экспресс - идентификации микроорганизмов рода *Vibrio* // Матер. XIМежгос. научно-практич. конференции Совр. технологии в совершенствовании мер предупрежд. и ответных действий на ЧС, 2012:160.
10. Водяницкая С.Ю., Телесманич Н.Р., Прометной В.И., Лях О.В., Чемисова О.С. «MALDI TOF - протеомный анализ в исследовании судовых балластных вод в портах Ростовской области // Материалы V ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням, 2013:91.

ПОСТУПИЛА 20.06.2013

УДК 371.71-057.875

Е.В. Харламов, Н.М. Попова, И.И. Готадзе

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕЗЕРВЫ СТУДЕНТОВ-МЕДИКОВ 2007–2012 ГОДОВ ОБУЧЕНИЯ

*Ростовский государственный медицинский университет,
кафедра физической культуры, лечебной физкультуры и спортивной медицины
Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: 1946.77@mail.ru*

Цель: изучение морфофункциональных особенностей студентов медицинского вуза.

Материалы и методы: обследовано 62 студента 1 курса, занимающихся в основной группе по физвоспитанию. Проанализировано 578 врачебно-контрольных карт физкультурника (ф.61) выпускников 2007 – 2012 годов обучения. При обследовании использовались следующие методики: соматотипирование, АД, пульсометрия, ЭКГ-диагностика, спирография, степэргометрия по тесту PWC 170. Расчетным методом определялся адаптационный потенциал, физическая работоспособность и МПК.

Результаты: 37% студентов 1-го курса, занимающиеся в основной группе по физвоспитанию, отнесенных к МаС и МеМаС – типам, имеют напряжение механизмов адаптации. У 28,5% девушек и 32,7% юношей – выпускников снижена физическая работоспособность и показатели жизнеобеспечения.