

- and Protozoan Diseases. Collection of Articles and Conference Abstracts [Novoe v diagnostike i lechenii gribkovykh i protozoynykh zabolovaniy. Sbornik statey i tezisev konferentsii]. Tashkent; 1998: 37–44. (in Russian)
- Dekhan-Khodzhaeva N.A., Shamsiev S.Sh., Shakirova R.Yu., Makarova G.I., Migbaeva Sh.N. Role in Paecilomyces in the etiology of protracted and recurrent bronchopulmonary diseases in children. *Pediatriya*. 1982; 61 (9): 12–4. (in Russian)
 - Akhunov V.M. *Features of Bronchial Asthma with Paecilomycosis*. Saarbrücken: M.: LAP Lambert Academic Publishing; 2014.
 - de Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd ed. Reus, Spain: Universitat Rovira i Virgili; 2000.
 - Luangsa-Ard J., Houbraken J., van Doorn T., Hong S.B., Borman A.M., Hywel-Jones N.L. et al. *Purpureocillium*, a new genus for the medical important Paecilomyces lilacinus. *FEMS Microbiol Lett*. 2011; 321 (2): 141–9.
 - Samson R.A. Paecilomyces and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology*. 1974; (6): 113.
 - Sigler L., Gibas C.F., Kokotovic B., Bertelsen M.F. Disseminated mycosis in veiled chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) caused by *Chamaeleomyces granulomatis*, a new fungus related to *Paecilomyces viridis*. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48 (9): 3182–92.
 - Uys C.J., Don P.A., Schrire V., Barnard C.N. Endocarditis following cardiac surgery due to the fungus Paecilomyces. *S. Afr. Med. J.* 1963; 37: 1276–80.

Поступила 24.10.16.
Принята к печати 29.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 579.852.11.083.1

Шаров Т.Н., Червакова М.П., Баркова И.А., Барков А.М., Викторов Д.В., Топорков А.В.

ПРОБЛЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ ВЕГЕТАТИВНОЙ ФОРМЫ *BACILLUS ANTHRACIS* МЕТОДОМ MALDI-ToF MS

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, Волгоград

Описан опыт применения масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для быстрой и надежной идентификации *Bacillus anthracis*, а также гетерологичных видов микроорганизмов. Освещены некоторые интересные особенности и трудности, возникшие в ходе идентификации.

Ключевые слова: масс-спектрометрия; *Bacillus anthracis*; идентификация; штамм.

Для цитирования: Шаров Т.Н., Червакова М.П., Баркова И.А., Барков А.М., Викторов Д.В., Топорков А.В. Проблемы идентификации различных штаммов вегетативной формы *Bacillus anthracis* методом MALDI-ToF MS. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (3): 316–318. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-316-318>

Sharov T.N., Chervakova M.P., Barkova I.A., Barkov A.M., Viktorov D.V., Toporkov A.V.

THE PROBLEMS OF IDENTIFICATION OF VARIOUS STRAINS OF VEGETATIVE FORM OF *BACILLUS ANTHRACIS* USING MALDI-ToF MS TECHNIQUE

The Volgogradskii research anti-plague institute of the Rosпотребнадзор, 400131 Volgograd, Russia

The article considers experience of application of mass-spectrometry with matrix-activated laser desorption/ionization for fast and reliable identification of *Bacillus anthracis* and heterologous species of microorganisms. The particular interesting characteristics and difficulties occurred during identification are covered.

Key words: mass-spectrometry; *Bacillus anthracis*; identification; strain

For citation: Sharov T.N., Chervakova M.P., Barkova I.A., Barkov A.M., Viktorov D.V., Toporkov A.V. The problems of identification of various strains of vegetative form of *Bacillus anthracis* using MALDI-ToF MS technique. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (3): 316–318. (in Russ.). DOI: [10.18821/0869-2084-2017-62-3-316-318](http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-316-318)

For correspondence: Sharov T.N., research worker of laboratory of most dangerous mycoses. e-mail: timursharov@gmail.com

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support

Received 06.07.2016
Accepted 01.09.2016

Введение. *B. anthracis* – единственный облигатный патоген человека и травоядных млекопитающих в группе близкородственных бацилл, именуемой *B. cereus sensu lato* (в широком смысле) [1]. В данную группу входят *B. cereus sensu stricto* (в узком смысле), *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis*. *B. cereus* – почвенный сапрофит, отдельные штаммы вызывают пищевые отравления с симптомами рвоты и диареи [2]. Многие штаммы *B. thuringiensis* содержат параспоровые кристаллические белки, токсичные для насе-

Для корреспонденции: Шаров Тимур Николаевич, науч. сотр. лаб. особо опасных микозов; e-mail: timursharov@gmail.com

комых и некоторых видов беспозвоночных [3]. *B. mycoides* и *B. pseudomycooides* – непатогенные сапрофиты, образующие колонии у корней растений [4]. Быстрая индикация *B. anthracis* осложняется высоким генетическим и фенотипическим сходством с другими видами группы *B. cereus* [5].

В последние 2 десятилетия масс-спектрометрия стала важным аналитическим инструментом, который обеспечивает высокую пропускную способность, чувствительность и специфичность анализа в микробиологии, клинической лабораторной диагностике, экологических исследованиях. Белковое профилирование на основе MALDI-ToF MS может быть использовано как альтернатива или дополнение гено-

типических или фенотипических методов для быстрой и эффективной идентификации микроорганизмов [6].

Цель работы – идентификация вегетативной формы *B. anthracis* методом масс-спектрометрии MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry).

Материал и методы. Штаммы. Использованы 10 вирулентных штаммов *B. anthracis* (81/1, 575/122, 614/1, 298/2, 591/2, 12/16, 619/42, 44/1CO, 248/22, 3-БК-2 II группы патогенности, вакцинный штамм *B. anthracis* Sterne 34F₂ III группы патогенности, штаммы 11 близкородственных бацилл: *B. cereus* (УНА, 1, 8035, VRRL569, ATCC 6464), *B. thuringiensis* var. Pasteur, *B. megaterium* (5, 216, 1), *B. subtilis* (6051, 6633), *B. stearothermophilus* ВКМВ718, *B. mycoides* 2, *B. mesentericus* 6 IV группы патогенности (коллекция живых культур ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора). Использованы клинические изоляты от больных: 6 штаммов *Staphylococcus aureus*, 6 штаммов *Escherichia coli* (IV группа патогенности).

Подготовка образцов. В соответствии с требованиями биобезопасности (Biosafety Level 3) и для эффективной экстракции клеточных белков штаммы *B. anthracis* готовили по методике инактивации высоковирулентных микроорганизмов и спор с использованием трифторуксусной кислоты (ТФК) [7], а также муравьиной кислоты (МК) [11, 12].

Штаммы культивировали на кровяном агаре: 300 мл ГРМ-агара (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск) + 20 мл донорской крови, затем дважды пассировали в аэробных условиях на питательном агаре («Fluka/Sigma-Aldrich») в течение 24 ч при 37°C. Материал с каждой чашки переносили в объеме, эквивалентном полной проволочной петле диаметром 3 мм в 20 мкл деионизированной воды (ДВ) (НПФ «Абрис»), инактивировали добавлением 80 мкл ТФК («PanReac/AppliChem»), после этого суспендировали на приборе ML-1 (Польша) в течение 30 мин, добавляли 300 мкл ДВ, проверяли на стерильность.

Подготовка проб с использованием МК (Реахим; ЗАО «Мосреактив») включала следующие этапы: в микропробирки вносили по 300 мкл ДВ, две полные проволочные петли бактерий, по 900 мкл 96° этанола, встряхивали на вортексе, центрифугировали при 13 тыс. об/мин в течение 2 мин. Удаляли из пробирок супернатант, осадок высушивали для полного удаления остатков этанола. К осадку добавляли 50 мкл 70% МК и 50 мкл ацетонитрила («PanReac/AppliChem»), тщательно перемешивали на вортексе, центрифугировали при 13 тыс. об/мин в течение 2 мин. Специфическую стерильность проверяли высевом на питательный агар.

Готовили пробы из микроорганизмов IV группы патогенности – *S. aureus* с ТФК, *E. coli* с МК [11, 12].

Согласно общепринятым протоколам пробоподготовки использовали супернатант, содержащий белки. Для сравнения результатов использовали и материал осадка. Для MALDI-ToF MS 2 мкл микробной взвеси смешивали с 2 мкл раствора α -циано-4-гидроксикоричной кислоты 12 мг/мл («Bruker Daltonics», Бремен, Германия). Раствор гидроксикоричной кислоты готовили предварительно, растворив навеску в смеси 100% ацетонитрила и 0,3% ТФК в соотношении 2:1 (объем/объем). Один микролитр смеси образца и гидроксикоричной кислоты помещали на металлическую мишень для образцов. После кристаллизации проб мишень с образцами помещали в камеру анализатора. В соответствии с инструкцией производителя программного обеспечения SARAMIS™ (Spectral Archive And Microbia Identification System, «SHIMADZU») на 2 лунки каждой мишени также наносили суспензии референсного штамма *E. coli* CCUG для калибровки прибора без предварительной пробоподготовки.

Регистрацию масс-спектров осуществляли на приборе Axima Performance с азотным лазером. Диапазон регистра-

MALDI-ToF MS-идентификация бактерий рода *Bacillus*

Штамм	Достоверность идентификации, %	
	супернатант	осадок
<i>B. anthracis</i> Sterne 34F2	<i>B. anthracis</i> 99,9	<i>B. anthracis</i> 91,2
<i>B. anthracis</i> 619/42	–	–
<i>B. anthracis</i> 3-БК-2	–	–
<i>B. anthracis</i> 44/2CO	<i>Arthrodermataceae</i> , 77	<i>S. aureus</i> 88,4
<i>B. anthracis</i> 2 98/2	–	–
<i>B. anthracis</i> 12/16	–	–
<i>B. anthracis</i> 81/1	–	–
<i>B. anthracis</i> 575/122	–	<i>B. anthracis</i> 99,9
<i>B. anthracis</i> 575/122 RO1	<i>B. cereus</i> 77	–
<i>B. anthracis</i> 614/1	<i>Actinomyces turicensis</i> 94,5	<i>B. anthracis</i> 82,7
<i>B. subtilis</i> 6021	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 81,9/ <i>B. subtilis</i> 86,9	–
<i>B. subtilis</i> 6633	<i>B. subtilis</i> 93,8	–
<i>B. mycoides</i> 2	–	–
<i>B. megaterium</i> 5	–	–
<i>B. mesentericus</i> 4	–	–
<i>B. thuringiensis</i>	–	–
<i>B. pseudoanthracis</i> 104	–	–
<i>B. cereus</i> 1	–	–
<i>B. cereus</i> 8035	<i>B. anthracis</i> 82	–
<i>B. cereus</i> 569VRRL	<i>B. cereus</i> 82,5	<i>B. anthracis</i> 77,8
<i>B. cereus</i> 87,5	–	–
<i>Bacillus</i> spp. 1–13*	<i>B. anthracis</i> 93,8	<i>B. cereus</i> 77
<i>Bacillus</i> spp. 1–14*	–	–

Примечание. * – штаммы, выделенные из объектов окружающей среды, идентифицированные не как *B. anthracis*.

ции составлял 2–12 000 м/z, фиксировались только положительные ионы, суммарный спектр каждого образца составляли на основе 100 единичных выстрелов. При анализе результатов учитывали следующие характеристики масс-спектра: количество пиков, их интенсивность, общую величину шумового компонента. Результирующий спектр каждого штамма экспортировали в базу данных SARAMIS™ («Anagnostisc GmbH», v. 3.62) для последующего анализа.

Результаты и обсуждение. Новая технология влечет за собой необходимость оценки эффективности используемого метода на различных объектах. Критериями оценки диагностической ценности иммуносерологических, молекулярно-генетических методов являются чувствительность, специфичность, специфическая активность, воспроизводимость. MALDI-ToF MS не является исключением. Появился ряд работ, посвященных оценке диагностической эффективности MALDI в сравнении с биохимическими и молекулярно-генетическими методами, основанными на секвенировании. Требовалось определить точность, надежность, воспроизводимость MALDI-ToF-масс-спектрометрии при использовании системы Axima Performance и программного обеспечения SARAMIS 3.62 и отработать методику пробоподготовки для *B. anthracis* (см. таблицу).

Оптимальным методом пробоподготовки для грамполо-

жительных (*S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria* spp., *Corynebacterium* spp.) и грамотрицательных (*Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Escherichia* spp.) бактерий III–IV группы патогенности является обработка МК [11, 12].

Подготовка образцов из высокопатогенных спорообразующих микроорганизмов (к которым относится *B. anthracis*) с использованием ТФК позволяет воспроизводить масс-спектры бактерий с большим количеством сигналов масс с низким уровнем шума. Большое количество сигналов масс и высокий уровень воспроизводимости необходимы для успешного применения техники масс-спектрометрии в микробиологической диагностике [7]. Мы использовали оба метода. Каждый образец контролировали высевом на специфическую стерильность, во всех случаях рост отсутствовал при контроле в течение 3–5 дней.

Только 4 из 10 штаммов *B. anthracis* и 4 из 10 штаммов близкородственных бацилл идентифицированы достоверно. Корректная идентификация происходила только при использовании для пробоподготовки ТФК. При применении МК и ацетонитрила достоверность определения составляла менее 70%. Согласно критериям программы, такой результат считается неудовлетворительным и в рабочем поле программы отображается как отсутствие совпадений с базой данных. При точности идентификации свыше 80% результат является приемлемым, от 90% и более – высоким.

Высокий показатель достоверности (более 90%) среди *B. anthracis* отмечен у штаммов Sterne 34F₂ и 575/122, причем вне зависимости от того, проводили ли пробоподготовку с ТФК или МК либо ацетонитрилом. Во всех случаях, помимо супернатанта, анализировали осадок, что иногда давало различающиеся результаты. В литературе аналогичных результатов нет. Необходимым условием успешной идентификации является наличие того или иного штамма микроорганизма в базе данных масс-спектров. Штамм *B. anthracis* Sterne 34F₂ широко распространен в коллекциях микроорганизмов в исследовательских центрах разных стран. Масс-спектры именно этого штамма представлены в подразделе *Bacillus* spp. в базе данных SARAMIS.

При создании референсных масс-спектров пики на них соответствуют рибосомальным белкам, которые присутствуют в клетке в наибольшем количестве. В каждой серии определений даже при соблюдении всех условий культивирования и пробоподготовки в качественном и количественном составе белков и пептидов, а соответственно в картине распределения масс-пиков наблюдаются различия. С учетом этого для повышения эффективности идентификации и дифференциации *B. anthracis* методом MALDI-ToF MS исследования направлены на поиск уникальных биомаркеров спор и вегетативных клеток [8–10].

Клинические штаммы *S. aureus* и *E. coli* идентифицировались со средним показателем достоверности 85%, при этом не было ни одного неидентифицированного образца. Это свидетельствует о том, что микроорганизмы, наиболее изученные и широко встречающиеся в клинической практике, демонстрируют высокие показатели достоверности и воспроизводимости при идентификации в MALDI-ToF, а также о необходимости непрерывно пополнять коллекцию эталонных спектров видов, которые отсутствуют или недостаточно представлены в коммерческих базах данных [13].

Заключение. Применение MALDI-ToF-масс-спектрометрии для идентификации некоторых возбудителей II группы патогенности не всегда гарантирует приемлемую точность и достоверность результата. При анализе экстрагируемых белков, находящихся в надосадочной жидкости, и клеточного осадка в одних измерениях получали разные результаты, в

других – практически идентичные. Пока не удалось выявить причины этого, работа в данном направлении продолжается.

Правильно подобранный метод пробоподготовки в значительной степени гарантирует успешную и достоверную идентификацию микроорганизмов. Коммерческие программы, интегрированные с базами данных масс-спектров, демонстрируют эффективность, их постоянное совершенствование и дополнение референсными масс-спектрами необходимо для решения научно-исследовательских задач и в практике клинической лабораторной диагностики.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yu G.X. Pathogenic *Bacillus anthracis* in the progressive gene losses and gains in adaptive evolution. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10 (Suppl. 1): S3.
2. Stenfors Arnesen L., Fagerlund A., Granum P. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008; 32 (4): 579–606.
3. Roh J., Choi J., Li M., Jin B., Je Y. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 17 (4): 547–59.
4. Nakamura L., Jackson M. Clarification of the Taxonomy of *Bacillus mycoides*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45 (1): 46–9.
5. Pilo P., Frey J. *Bacillus anthracis*: Molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution (Review). *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11 (6): 1218–24.
6. Sauer S., Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8 (1): 74–82.
7. Lasch P., Nattermann N., Erhard M., StEammler M., Grunow R., Bannert N., Appel B., Naumann D. MALDI-ToF mass spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. *Anal. Chem.* 2008; 80 (6): 2026–34.
8. Lasch P., Beyer W., Nattermann H., Stammler M., Siegbrecht E., Grunow R. et al. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75 (22): 7229–42.
9. Hotta Y., Sato H., Hosoda A., Tamura H. Classification of the genus *Bacillus* based on MALDI-ToF MS analysis of ribosomal proteins coded in *S10* and *spc* operons. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59 (10): 5222–30.
10. Dybwad M., van der Laaken A., Blatny M., Paauc 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.
11. TeKippe M.E., Shuey S., Winkler D.W., Butler M.A., Burnham C.A. Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51 (5): 1421–7.
12. Ford B.A., Burnham C.A. Optimization of routine identification of clinically relevant Gram-negative bacteria by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Bruker Biotyper. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51 (5): 1412–20.
13. Christensen J., Rintas D., Hammer M., Justesen U. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of Gram-positive, catalase-negative cocci not belonging to the *Streptococcus* or *Enterococcus* genus and benefits of database extension. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50 (5): 1787–91.

Поступила 06.07.16

Принята к печати 01.09.16