

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Шаров Т.Н., Будченко А.А., Викторов Д.В., Топорков А.В.

ПРИМЕНЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ВИРУСОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

Актуальность проблемы своевременной диагностики вирусных инфекций в настоящее время сложно переоценить. По данным ВОЗ, ежегодно регистрируются десятки вспышек заболеваний вирусной природы как в развивающихся, так и в развитых странах. При этом только один вирус сезонного гриппа способен поражать до 20% населения даже в европейских странах с высоким уровнем медицины. Ежегодное количество смертей по причине вирусных инфекций согласно официальной статистике превышает 600 тыс. человек по всему миру. Расширение арсенала надёжных и достаточно быстрых методов диагностики вирусных заболеваний позволило бы внести значительный вклад в снижение показателей заболеваемости и смертности. Молекулярно-генетические методы в данный момент остаются наиболее распространённым способом идентификации вирусов в клинической лабораторной диагностике, однако они обладают рядом недостатков, таких как необходимость проведения диагностических исследований в специализированных условиях. В связи с этим имеющийся спектр инструментов для идентификации и исследования опасных для человека вирусов нуждается в постоянном дополнении и усовершенствовании. Метод MALDI-ToF масс-спектрометрии сочетает в себе степень точности и универсальности, достаточные как для идентификации клинических штаммов, выделенных от больных, так и для изучения фенотипических свойств вирусов в условиях исследовательских лабораторий и центров. Приведена и обобщена основная информация об уже существующем или потенциально возможном применении метода времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией для идентификации вирусов.

Ключевые слова: времяпролётная масс-спектрометрия; вирусы; протеомный анализ.

Для цитирования: Шаров Т.Н., Будченко А.А., Викторов Д.В., Топорков А.В. Применение масс-спектрометрического метода для изучения и идентификации клинически значимых вирусов (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (8): 480-483. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-480-483>

Для корреспонденции: Шаров Тимур Николаевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. протеомного анализа; e-mail: timursharov@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 28.03.2022

Принята к печати 27.05.2022

Опубликовано 15.08.2022

Sharov T.N., Budchenko A.A., Viktorov D.V., Toporkov A.V.

THE APPLICATION OF MASS SPECTROMETRY METHOD FOR THE STUDY AND IDENTIFICATION OF MEDICALLY IMPORTANT VIRUSES (REVIEW OF LITERATURE)

Federal Government Health Institution «Volgograd Plague Control Research Institute» of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

It is difficult to overestimate the urgency of the problem of well-timed diagnosis of viral infections. According to the WHO, dozens of outbreaks of viral diseases are recorded annually, both in developing and developed countries. Moreover, the seasonal flu virus alone is capable of infecting up to 20% of the population, even in European countries with a high level of medicine. And the annual number of deaths due to viral infections, according to official statistics, exceeds 600 thousand people around the world. That's why the provision of a reliable and fairly rapid diagnosis of viruses, along with subsequent therapy, makes a significant contribution to reducing the incidence of mortality. Despite the fact that PCR-based methods currently remain the most common method for identifying viruses in clinical practice, as recent experience shows, in addition to the already known disadvantages, in the event of large outbreaks, such test systems may simply not be in the required amount. In this regard, it is necessary to supplement and improve the existing tools for identification and research of clinically significant viruses. The MALDI-TOF mass spectrometry method combines a degree of accuracy and versatility, sufficient both for the identification of clinical strains isolated from patients, and for the study of the phenotypic properties of viruses in research laboratories and centers. This article presents and summarizes the main data on the existing or potential application of the method of time-of-flight mass spectrometry with matrix-associated laser desorption / ionization for the identification or study of viruses.

Key words: time-of-flight mass spectrometry; viruses; proteomic analysis.

For citation: Sharov T. N., Budchenko A. A., Viktorov D. V., Toporkov A. V. The application of mass spectrometry method for the study and identification of medically important viruses (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 480-483 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-480-483>

For correspondence: Sharov T.N., Cand. Sci. Med., senior researcher of the laboratory of proteome analysis; e-mail: timursharov@gmail.com

Information about authors:

Sharov T.N., <https://orcid.org/0000-0002-7906-1708>;
Budchenko A.A., <https://orcid.org/0000-0002-8346-8500>;
Viktorov D.V., <https://orcid.org/0000-0002-2722-7948>;
Toporkov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 28.03.2022

Accepted 27.05.2022

Published 15.08.2022

Быстрая и точная идентификация возбудителя, в том числе вирусной природы, во многих случаях критически важна для выбора терапии, последующей оценки её эффективности и корректировки, прогноза заболевания в целом [1]. Схожесть клинических признаков многих вирусных инфекций различной этиологии делает лабораторный анализ важнейшей частью их диагностики [2]. Соответственно, совершенствование имеющихся методов идентификации вирусов, вызывающих у человека заболевания, постоянный поиск новых диагностических инструментов является актуальным аспектом как для специалистов медицинских учреждений, так для научных сотрудников в исследовательских центрах.

Метод масс-спектрометрии применяется несколько десятилетий в большинстве областей человеческой деятельности, где требуется качественный или количественный анализ вещества [3–5], и имеет свои устойчивые ниши, как в клинической лабораторной диагностике, так и в сфере фундаментальных или прикладных исследований. Времяпролётная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) нашла наибольшее применение в медицинских учреждениях, прежде всего, как инструмент скрининга большого количества образцов культур микроорганизмов, выделенных из клинического материала (кровь, раневое отделяемое). Масс-спектрометрический метод идентификации микроорганизма основан на выявлении полного спектра клеточных белков, формирующих индивидуальный для каждого вида или даже штамма профиль [6]. Чаще всего белковый профиль определяется консервативными рибосомальными белками, поскольку они представлены наиболее количественно [7]. В целом протеомный состав клетки микроорганизма может в различной степени варьироваться даже среди штаммов одного вида в зависимости от условий роста, наличия резистентности к антибиотикам и многих других факторов. Благодаря этому возможно определение таксономической принадлежности и свойств микроорганизма по его изменению в масс-спектрограмме [8]. Наличие пополняемых коммерческих баз данных масс-спектров, простота и дешевизна проведения анализа позволяют использовать MALDI-ToF MS в качестве рутинного метода наряду с бактериологическим или ПЦР-методами. К его недостаткам можно отнести, прежде всего, стоимость приобретения масс-спектрометров, необходимость наличия чистой культуры микроорганизма для анализа. Развитие технологии MALDI-ToF MS в течение последних лет, совершенствование оборудования и программного обеспечения для масс-спектрометрического анализа позволили свести перечисленные недостатки к минимуму. Функциональные линейки приборов в последние годы значительно расширились, что в совокупности позволя-

ет приобретать MALDI-ToF-анализаторы для решения конкретных задач даже не самым крупным диагностическим лабораториям и стационарам. Совершенствование методик выделения белковых компонентов микроорганизмов, аналитического программного обеспечения значительно расширяет возможности по анализу собственно клинического материала, без предварительного получения чистой культуры микроорганизма [9]. Крупные коммерческие базы данных масс-спектров микроорганизмов регулярно дополняются и включают в себя референсные масс-спектры нескольких тысяч видов клинически значимых бактерий и микромицетов, в том числе, штаммы с различной вирулентностью и антибиотикорезистентностью [10–12].

С самого начала применения MALDI-ToF масс-спектрометрии для определения видовой принадлежности микроорганизмов отдельным пунктом стоял вопрос идентификации вирусов [13]. Строчение вирионов, особенности их культивирования делают крайне затруднительным проведение прямого белкового профилирования, как в случае с бактериями или микромицетами. Капсиды вирионов могут содержать в своем составе от нескольких десятков до сотни видов белков [14], однако за счёт небольшого размера количество материала для анализа в них очень мало в сравнении, например, с бактериями. Даже при использовании такого чувствительного метода, как MALDI-ToF масс-спектрометрия, для идентификации требуется относительно высокая концентрация вирионов в исследуемом материале [15]. Для культивирования вирусов необходимы специальные клеточные линии, имеющие собственные белки. Чтобы получить масс-спектр вирусных частиц, их необходимо отделить от компонентов культуры клеток, что представляет собой сложную задачу даже для исследовательской лаборатории [16].

В масс-спектрометрическом методе изучения и идентификации вирусов можно выделить два раздела: идентификацию отдельных компонентов вируса белковой природы после процедуры предварительной пробоподготовки и прямое определение белкового профиля вируса в клиническом материале.

В первом случае наиболее широко применяется выделение и очистка компонентов вирусов с помощью аффинной хроматографии. Инактивированный лизат клеток, заражённых исследуемым вирусом, инкубируют со специально подобранным лигандом, иммобилизованным на носителе, как правило, на полимерных гранулах. После элюции и ферментативной обработки белковую смесь разделяют и исследуют с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии, что позволяет идентифицировать десятки белков из общей смеси за один этап. В работе описан эксперимент по детекции вирусных белков методом MALDI-ToF MS и использованию поис-

ковой машины MASCOT [17]. Путём подбора оптимального метода пробоподготовки, лигандов для аффинной хроматографии, исследователи выделили специфичные белки, участвующие во взаимодействии с организмом, а затем определили их структуру с помощью масс-анализатора [17]. Схожая работа проведена Z.H. Davis и соавт. [18]: при анализе вирусных компонентов методом сопоставления масс-спектров выделенных белков удалось определить протеомный состав исследуемого вируса, построить карту белок-белкового взаимодействия организма больного и различных вирусов (герпесвирус, вирус иммунодефицита человека). Используя данный метод, выделены белки вируса гепатита С, специфически взаимодействующие с гепатоцитами при поражении печени [19]. Во всех описанных случаях итоговый анализ массивов данных проведён с помощью специального программного обеспечения для статистической обработки.

В последнее десятилетие усилия многих исследователей направлены на поиск возможности идентифицировать возбудителей инфекционных заболеваний напрямую в клиническом материале. Наибольших успехов удалось достичь при анализе бактериальных белков. Использование специальных протоколов для выделения, хромато-масс-спектрометров для разделения компонентов смеси, в сочетании с базами данных бактериальных масс-спектров позволяет проводить идентификацию бактерий в образцах крови. Даже в этом случае точность идентификации может варьировать от 60 до 90% [20]. А при детекции вируса в крови или моче к проблеме интерпретации масс-спектра добавляется малое количество собственно вирусных белков на общей спектрограмме. Основная масса работ в данной области подразумевает предварительную хроматографическую очистку или разделение компонентов клинического материала [21]. Вопрос о потенциально возможных методах определения белкового состава вирусных частиц в клиническом материале остается актуальным, поскольку во многих случаях нет ни времени, ни возможности проводить выделение отдельных вирусных компонентов.

Изучена возможность создания собственного массива характеристических масс-пиков SARS-CoV-2, в исследовании проанализирована значительная выборка масс-спектров (свыше 300) образцов клинического материала, часть из которых выделена от больных с диагнозом COVID-19, подтверждённым результатами ПЦР-анализа [22]. Предварительную обработку материала осуществляли как в стандартном методе пробоподготовки возбудителей III-IV групп патогенности для анализа методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Данные о характеристиках массовых пиков в получившемся спектре анализировали с помощью программного обеспечения для выявления масс-спектрометрических биомаркёров. Одной из отличительных особенностей данной работы стало использование авторами не только стандартных тестов на корреляцию (критерий Вилкоксона, дисперсионный тест), но и машинного обучения для создания моделей автоматической классификации пиков с помощью алгоритма «k-ближайшего соседа». По результатам определено, что специфичность метода – 71%, точность – 68% [22].

Данная работа представляется очень важной, поскольку, в отличие от множества предшествующих исследований в направлении масс-спектрометрической идентификации вирусов, авторы впервые сделали упор

не на этап пробоподготовки, а на обработку и анализ информации о масс-спектрах с помощью технологии машинного обучения, что позволило исключить значительную часть неинформативных массовых пиков. Такой подход обладает большим потенциалом благодаря тому, что за последние годы методы биоинформатики и обработки данных значительно продвинулись вперед. Хотя показатели точности и чувствительности в описанном методе пока не столь велики, как у ПЦР, это значимый прогресс, поскольку ранее прямое профилирование вирусов методом MALDI-ToF с приемлемым уровнем достоверности вообще представлялось маловероятным. Дальнейшие исследования в этом направлении, несомненно, способствуют повышению точности и специфичности анализа.

Отдельно следует выделить использование масс-спектрометрического анализатора в качестве точного детектора молекулярной массы получившихся продуктов реакции амплификации. Наиболее широко известным способом такого применения масс-спектрометрии служит детекция однонуклеотидных полиморфизмов (SNP-анализ), хорошо зарекомендовавшая себя в течение последних лет [23]. В данном методе проводят амплификацию генетического материала вируса, а с помощью времяпролетного масс-спектрометра с MALDI-ионизацией осуществляется идентификация продукта амплификации в виде появления рассчитанного массового пика в сравнении с отрицательным контролем. Точности прибора достаточно для выявления разницы масс в один нуклеотид, а сам метод относительно быстрый и менее трудоёмкий по сравнению с обычным для SNP-анализа способом регистрации результата. Масс-спектрометрический способ детекции позволяет отказаться от специфической флуоресцентной метки, проводить несколько реакций элонгации праймеров в одной пробирке [24]. При применении метода MALDI-ToF масс-спектрометрии для определения молекулярной массы продуктов амплификации удалось не только выявить вирус SARS-CoV в клиническом материале, но и достичь большей точности по сравнению с обычным методом детекции [25]. Результаты работ в данном направлении свидетельствуют об эффективности использования масс-спектрометрического метода в лабораторной диагностике вирусов даже во вспомогательной роли.

По результатам анализа представленных данных из разных источников литературы можно сделать заключение, что масс-спектрометрический метод демонстрирует значительный потенциал в области идентификации клинически значимых вирусов. В совокупности с алгоритмом машинного обучения, методом многофакторного анализа и статистической постобработкой данных, протеомный анализ выходит за рамки традиционных ниш его использования и может стать быстрым и надёжным инструментом в области вирусологических исследований. Следует отметить растущую роль биоинформационного анализа как в протеомике в целом, так и в области фундаментального и прикладного изучения микроорганизмов и их взаимодействия с организмом человека. Современные методы исследования оперируют большими массивами информации, обработка и анализ которых невозможны без специализированного программного обеспечения, наличия как минимум базовых знаний из областей информатики и статистики. Существующая тенденция к частичной автоматизации

расчётов, дополнение белковых и геномных баз данных, использование технологий машинного обучения, несомненно поспособствуют дальнейшему развитию в области протеомного анализа вирусов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Carolina Scagnolari, Ombretta Turriziani, Katia Monteleone, Alessandra Pierangeli, Guido Antonelli. Consolidation of molecular testing in clinical virology. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2017; 15(4):387-400. DOI: 10.1080/14787210.2017.1271711. Epub. 2016 Dec 24.
2. Naru Zhang, Lili Wang, Xiaoqian Deng, Ruiying Liang, Meng Su, Chen He et al. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *J. Med. Virol.* 2020; 92(4):408-17. DOI: 10.1002/jmv.25674. Epub. 2020 Feb 4.
3. Bittremieux W., Tabb D.L., Impens F., Staes A., Timmerman E., Martens L., Laukens K. Quality control in mass spectrometry-based proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* 2018 Sep; 37(5):697-711. DOI: 10.1002/mas.21544. Epub. 2017 Sep 7.
4. Jannetto P.J., Danso D. Mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 2020 Aug; 82:1. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2020.06.003. Epub. 2020 Jun 5.
5. Savaryn J.P., Toby T.K., Kelleher N.L. A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics.* 2016 Sep; 16(18): 2435-43. DOI: 10.1002/pmic.201600113. Epub. 2016 Aug 24.
6. Pu F., Chiang S., Zhang W., Ouyang Z. Direct sampling mass spectrometry for clinical analysis. *Analyst.* 2019 Feb 11;144(4):1034-51. DOI: 10.1039/c8an01722k.
7. Sandrin T. R., Demirev P. A. Characterization of microbial mixtures by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2018 May; 37(3):321-49. DOI: 10.1002/mas.21534. Epub. 2017 May 16.
8. Saleh S., Staes A., Deborggraeve S., Gevaert K. Targeted Proteomics for Studying Pathogenic Bacteria *Proteomics.* 2019 Aug; 19(16):e1800435. DOI: 10.1002/pmic.201800435. Epub. 2019 Jul 25.
9. Hou T., Chiang-Ni C., Teng S. Current status of MALDI-ToF mass spectrometry in clinical microbiology. *J. Food Drug. Anal.* 2019 Apr; 27(2):404-14. DOI: 10.1016/j.jfda.2019.01.001. Epub. 2019 Jan 31.
10. Fernández-Esgueva M., Fernández-Simon R., Monforte-Cirac M.L., López-Calleja A., Fortuño B., Viñuelas-Bayon J. Use of MALDI-ToF MS (Bruker Daltonics) for identification of Mycobacterium species isolated directly from liquid medium. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. (Engl. Ed).* 2021 May;39(5):241-3. DOI: 10.1016/j.eimc.2020.05.011. Epub. 2020 Jun 12.
11. Heireman L., Patteet S., Steyaert S. Performance of the new ID-fungi plate using two types of reference libraries (Bruker and MSI) to identify fungi with the Bruker MALDI Biotyper. *Med. Mycol.* 2020 Oct 1; 58(7):946-57. DOI: 10.1093/mmy/myz138.
12. Pinheiro D., Monteiro C., Faria M. A., Pinto E. Vitek ® MS v3.0 System in the Identification of Filamentous Fungi. *Mycopathologia.* 2019 Oct; 184(5):645-51. DOI: 10.1007/s11046-019-00377-0. Epub. 2019 Sep 10.
13. Ashcroft A. E. Mass spectrometry-based studies of virus assembly. *Current Opinion in Virology.* 2019; 36: 17-24.
14. Bucci M. Capsids under pressure. *Nature Chemical Biology.* 2018 Feb 14; 14:199. DOI:10.1038/nature25438 (2018).
15. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K., Virdi J. S. MALDI-ToF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015 Aug 5; 6:791. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00791. eCollection 2015.
16. Sviben D., Forcic D., Halassy B., Allmaier G., Marchetti-Deschmann M., Bergles M. Mass spectrometry-based investigation of measles and mumps virus proteome. *Virol. J.* 2018 Oct 16;15(1):160. DOI: 10.1186/s12985-018-1073-9.
17. Wang L., Ding X., Xiao J., Jiménez-Góngora T., Liu R., Lozano-Durán R. Inference of a Geminivirus-host protein-protein interaction network through affinity purification and mass spectrometry analysis. *Viruses.* 2017 Sep 25; 9(10):275. DOI: 10.3390/v9100275.
18. Davis Z. H., Verschuere E., Jang G. M. Global mapping of herpesvirus-host protein complexes reveals a transcription strategy for late genes. *Mol. Cell.* 2015 Jan 22; 57(2):349-60. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.11.026. Epub. 2014 Dec 24.
19. Ramage H. R., Kumar G. R., Verschuere E., Johnson J. R. A combined proteomics/genomics approach links hepatitis C virus infection with nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell.* 2015 Jan 22; 57(2): 329-40. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.12.028.
20. Nomura F., Tsuchida S., Murata S., Satoh M. Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection. *Clinical Proteomics.* 2020 May 13; 17: 14. DOI:10.1186/s12014-020-09278-7.
21. Mahmud I., Garrett T. J. Mass Spectrometry techniques in emerging pathogens studies: COVID-19 perspectives. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2020 Sep 3; 31(10). DOI:10.1021/jasms.0c00238.
22. Rocca M. F., Zintgraff J. C., Datteroc M. E., Santos L. S. A combined approach of MALDI-ToF mass spectrometry and multivariate analysis as a potential tool for the detection of SARS-CoV-2 virus in nasopharyngeal swabs. *J. Virol. Methods.* 2020 Dec; 286: 113991. DOI: 10.1016/j.jviromet.2020.113991.
23. Liu N., Wang L., Cai G., Zhang D., Lin J. Establishment of a simultaneous detection method for ten duck viruses using MALDI-ToF mass spectrometry. *J. Virol. Methods.* 2019 Nov; 273:113723. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113723. Epub 2019 Aug 17.
24. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K., Virdi J. S. MALDI-ToF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 2015 Aug 5; 6:791. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00791. eCollection 2015.
25. Xiu L., Zhang C., Wu Z. Establishment and application of a universal coronavirus screening method using MALDI-ToF mass spectrometry. *Front. Microbiol.* 2017 August 09; 8:1510. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01510.