

УДК 616-093 / - 098 : 004.041

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАКЕТА MALDIquant ДЛЯ ПРОГРАММНОЙ СРЕДЫ R В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ *S. AUREUS* И *P. AERUGINOSA*

В.В. Денисенко^{1,2}, А.В. Алешукина¹, И.С. Алешукина¹, В.С. Зубцов²,
А.В. Горовцов²

¹ФБУН Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

²Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

С целью изучения возможности выявления отличий в масс-спектрах чувствительных и устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий с помощью программной среды R и пакета MALDIquant проанализировано 8 штаммов *P. aeruginosa* и 9 штаммов *S. aureus*. Для каждого вида было отобрано по одному чувствительному и одному резистентному к антибиотикам штамму. Устойчивость изучалась по отношению к азитромицину, меропенему, ципрофлоксацину, амикацину, цефиксиму и цефотаксиму. Масс-спектры бактерий строились с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра microflex (Bruker, Германия). Для предварительной обработки масс-спектров, использовался пакет программной среды R — MALDIquant. Для каждой бактерии было отобрано по 5 областей спектра вероятно ответственных за резистентность к антибиотикам. Установлено, что наличие пиков в областях $m/z = 5383, 6977, 4882, 3005, 6621$ спектров *P. aeruginosa* и $m/z = 3876, 6556, 12542$ спектров *S. aureus* может свидетельствовать об их антибиотикорезистентности.

Ключевые слова: резистентность, чувствительность, антибиотики, масс-спектрометрия, *S. aureus*, *P. aeruginosa*

MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF ANTIBIOTIC-RESISTANT *S. AUREUS* AND *P. AERUGINOSA* USING THE MALDIQUANT R PACKAGE

V.V. Denisenko^{1,2}, A.V. Aleshukina¹, I.S. Aleshukina¹, V.S. Zubtsov², A.V. Gorovtsov²

¹Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russia

²Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

The purpose of this paper is to study the differences in the mass spectra of bacterial strains that are sensitive or resistant to antibiotics. The resistance of eight *P. aeruginosa* strains and nine *S. aureus* strains to several antibiotics such as azithromycin, meropenem, ciprofloxacin, amikacin, cefixime, cefotaxime was studied. One antibiotic-sensitive strain and one antibiotic-resistant strain were selected for each bacterium. Mass spectra of bacteria were obtained using a MALDI-TOF microflex mass spectrometer (Bruker, Germany). The R software environment and the MALDIquant package were used for processing of mass spectrometry data. It was found that the presence of peaks in the regions $m/z = 5383, 6977, 4882, 3005, 6621$ of *P. aeruginosa* spectra and $m/z = 3876, 6556, 12542$ of *S. aureus* spectra may indicate their antibiotic resistance.

Keywords: antibiotic resistance, antibiotic sensitivity, mass spectrometry, *S. aureus*, *P. aeruginosa*

Введение

В настоящее время инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), являются одной из основных причин заболеваемости и смертности госпитализированных больных. Частота ИСМП зависит от типа стационара, степени инвазии и сложности аппаратного лечебно-диагностического процесса, характера основной патологии, тактики применения антибактериальных препаратов, дезинфектантов, УФ-излучения и др. факторов. Основными возбудителями ИСМП в стационарах являются стафилококки (*S. aureus*, *S. epidermidis*), грамотрицательные бактерии (*E. coli*, *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., неферментирующие бактерии), грибы рода *Candida* и др.[1,2,3]. Возрастает внимание к проблеме резистентности микроорганизмов к антибиотикам, которая становится одним из

факторов, приводящим к сдерживанию широкого использования антибиотиков в медицинской практике [4].

Известно, что перенос генетической информации, в том числе и признака антибиотикорезистентности у бактерий осуществляется с участием мобильных элементов — плазмид, транспозонов, интегров и др [5]. При этом плазмиды устойчивости к антибиотикам тяжелые (70-300кДа) и определяют признак резистентности к одному или нескольким препаратам сразу. Встречаются плазмиды, несущие устойчивость не только к антибиотикам, но и к дезсредствам, ультрафиолетовому облучению. Они характеризуются как «острова патогенности» [6]. Открытие и изучение таких интегров показало их важную роль в эволюции геномов бактерий [3,7].

В настоящее время антибиотикорезистентность тестируется методом ПЦР по определению генетических маркеров. Так, Царев В. Н. с соавт. (2016) выявил у анаэробных бактерий генетические маркеры устойчивости к бета-лактамам антибиотикам (STX-M и MECA-цефалоспорины), к карбапенемам (VIM и NDM, но не Окса-48), гликопептидам (Van A и Van B), макролидам (ERM), тетрациклину (Tet) и плазмидам QNR (A, B) к фторхинолонам [8]. Гордеевым А.Б. с соавт. (2017) было обнаружено у эпидермальных стафилококков 15 различных генов, обуславливающих резистентность штаммов к аминогликозидам, бета-лактамам антибиотикам, фузидиевой кислоте, макролидам, линкозамидам, стрептограмину В, тетрациклину и триметоприму [9].

Метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) используется клиническими микробиологическими лабораториями для идентификации микроорганизмов. Этот метод позволяет определять видовую принадлежность большинства клинически значимых бактерий с достаточной степенью достоверности. Преимуществами метода масс-спектрометрической идентификации являются быстрота, точность и экономичность исследования. Суть метода состоит в анализе масс-спектров входящих в микроорганизм белковых молекул, которые уникальным образом характеризуют его. Однако стандартная методика MALDI-TOF не позволяет обнаружить наличие или отсутствие резистентности исследуемых микроорганизмов к антибиотикам. Хотя, учитывая белковую природу и величину плазмид резистентности, можно предположить их наличие на масс-спектрах резистентных культур.

Цель работы - изучить возможность выявления отличий в масс-спектрах чувствительных и устойчивых к антибиотикам штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa* с помощью программной среды R и пакета MALDIquant.

Материалы и методы

Из рабочего музея лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования было взято 8 штаммов *P. aeruginosa* и 9 штаммов *S. aureus*. Изучение устойчивости к азитромицину, меропенему, ципрофлоксацину, амикацину, цефиксиму, цефотаксиму производилось с помощью баканализатора Vitek-2 (Франция). Из 8 штаммов *P. aeruginosa* был отобран один штамм чувствительный к названным антибиотикам и один устойчивый. Аналогично из 9 штаммов *S. aureus* были отобраны один чувствительный и один устойчивый.

Масс-спектры бактерий строились с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра microflex (Bruker, Германия). Для чувствительного и устойчивого к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa* было получено 14 и 21 повторных масс-спектров соответственно, а для чувствительного и устойчивого штаммов *S. aureus* — 34 и 35.

Поиск возможных маркеров резистентности к антибиотикам выполнялся в программной среде R. Эта среда является бесплатным программным обеспечением с открытым исходным кодом и предназначена для статистической обработки данных и работы с графикой. Для предварительной обработки масс-спектров, использовался пакет программной среды R — MALDIquant. Данный пакет позволяет преобразовывать необработанные масс-спектры в вид, удобный для последующего анализа в среде R [10,11].

Предварительная обработка спектров с помощью пакета MALDIquant состояла из следующих шагов:

1. Импорт необработанных спектров в среду R.
2. Применение к спектрам сглаживания, необходимого для фильтрации высокочастотного шума.
3. Вычитание из спектров базовой линии, представляющей собой повышение интенсивности в области низких значений масса/заряд (m/z).
4. Нормализация, необходимая для корректировки различий в интенсивности спектров, вызванных, в частности, тем, что для получения различных спектров использовалось различное количество лазерных импульсов.
5. Процедура выравнивания спектров по оси m/z .
6. Усреднение повторных спектров для одних и тех же штаммов.
7. Использование алгоритма обнаружения пиков, необходимого как для определения характеристик пиков, так и для уменьшения объёма анализируемых данных.
8. Процедура выравнивания пиков, необходимая для коррекции их сдвигов вдоль горизонтальной оси.
9. Создание матрицы характеристик пиков

10. Построение диаграмм.

Результаты и обсуждение

Сравнение усредненных спектров резистентных (устойчивых) и чувствительных к антибиотикам культур *P. aeruginosa* (рисунок 1) и *S. aureus* (рисунок 2) показало, что спектр *P. aeruginosa* содержит большее число различных «минорных» и «мажорных» пиков (табл. 1).

Таблица 1

Распределение Minor-пиков и Major-пиков *P. aeruginosa* и *S. aureus*

MS-пики бактерий (m/z)			
<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
Minor-пики	Major-пики	Minor-пики	Major-пики
2211 2600 2866 3020 3172 3340 3370 3443 3599 3614 3660 4176 4468 4848 4993 5114 5470 5796 6354 6494 6678 6918 7028 7207 7488 7577 7600 7927 8373 8793 8885 8947 9054 9628 9706 9772 9798 9995 10238 10960 11445 11480 11596 12233 13953 14058	2720 3804 4281 4435 4543 5211 5451 5738 6049 7618 8572 9097	2083 2147 2194 2282 2300 2511 2647 2757 2962 3020 3036 3172 3406 3420 3441 3783 4446 4591 4815 5053 5306 5441 5545 5936 6354 6427 6556 6621 6822 6848 7577 8889 9628 10107 10483 11539	2631 2976 3004 4306 5034 5528 6893
Итого: 46	Итого: 12	Итого: 36	Итого: 7

Minor-пики («минорные» пики) / Major-пики («мажорные» пики) – учитывают длину пролета, высоту пика масс-спектрограммы, которая складывается из частоты повторности показателя отношения m/z.

Гипотетически удлинение масс-спектра *P. aeruginosa* может быть связано с наличием у микроорганизма интегров, кодирующих антибиотикорезистентность. Фрагменты интегона на спектрограмме могут обнаруживаться как среди Minor-пиков, так и среди Major-пиков, т.к. они подвергаются кислотному гидролизу в «хаотичном» порядке. Известно, что интегроны псевдомонад достигают больших размеров по сравнению с плазмидами стафилококков. Вероятно, с этим связано наличие большего числа различных пиков на масс-спектрах *P. aeruginosa* и их разнообразие.

Проведенное исследование выявило различия в масс-спектрах чувствительных и устойчивых к антибиотикам штаммов. В результате анализа были найдены области значений m/z масс-спектров, наличие пиков в которых может свидетельствовать о резистентности *S. aureus* и *P. aeruginosa* к антибиотикам. Для каждого вида было отобрано по 5 областей спектров, вероятно, ответственных за резистентность к антибиотикам (табл. 2).

Таблица 2

Перспективные области масс-спектров вероятно ответственные за резистентность к антибиотикам

Тестируемая бактерия	Значение m/z.				
<i>P. aeruginosa</i>	5383	6977	4882	3005	6621
<i>S. aureus</i>	3876	6556	12542		

Однако, необходимо отметить, что кроме областей, потенциально ответственных за резистентность к антибиотикам (пики, в которых обнаруживались только у резистентных культур), были отмечены области масс-спектров, пики, в которых фиксировались только у чувствительных к антибиотикам штаммов и не обнаруживались у резистентных культур (рисунок 4 и 6). Для каждого вида было также отобрано по 5 таких областей (табл. 3).

Таблица 3

Области масс-спектров, пики в которых фиксируются только у чувствительных к антибиотикам штаммов

Тестируемая бактерия	Значение m/z.				
<i>P. aeruginosa</i>	6266	3130	3428	4941	2758
<i>S. aureus</i>	6573	4802	4578	6495	12462

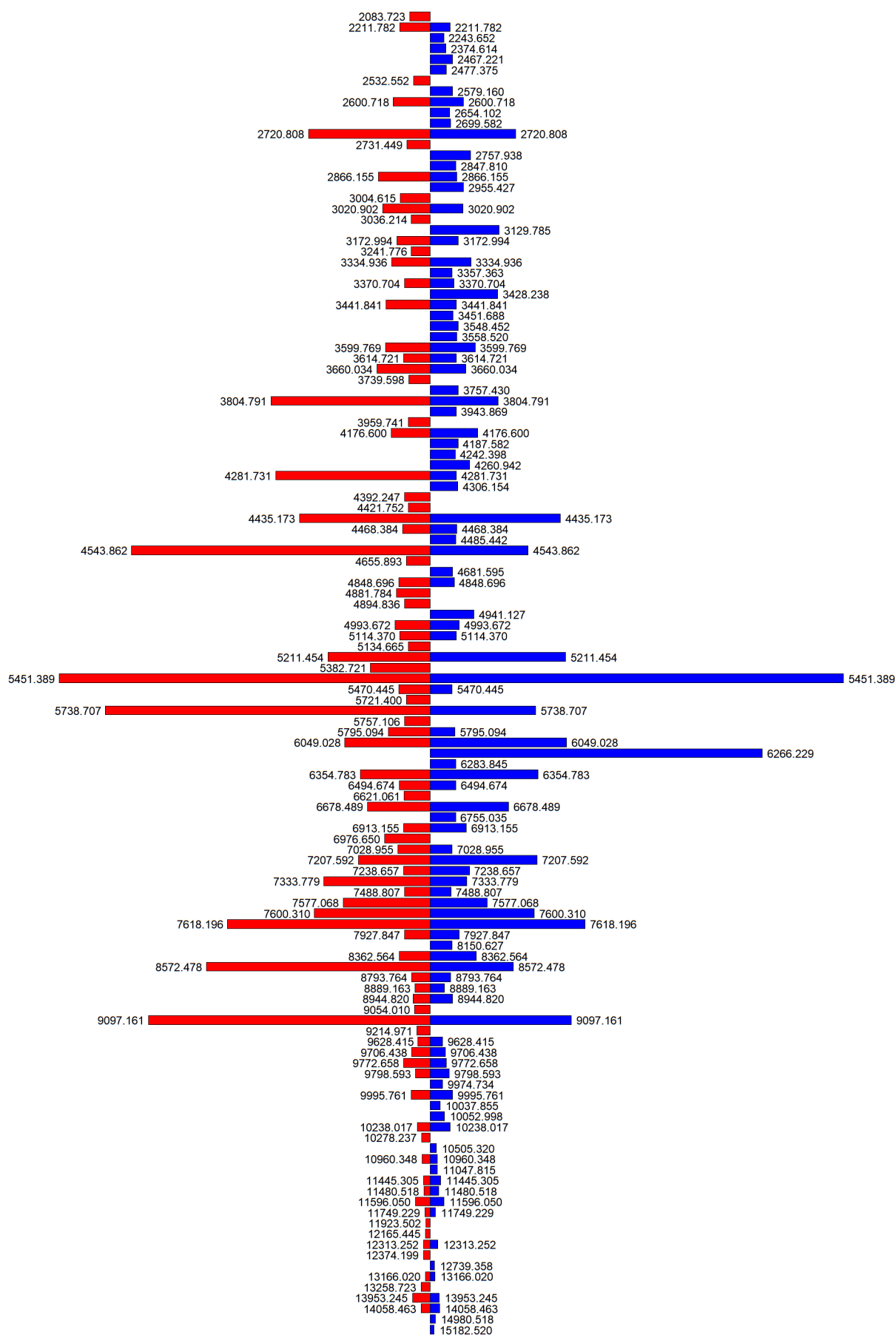


Рис. 1 Сравнение пиковых значений усредненных спектров устойчивого (красный) и чувствительного (синий) штаммов *P. aeruginosa*

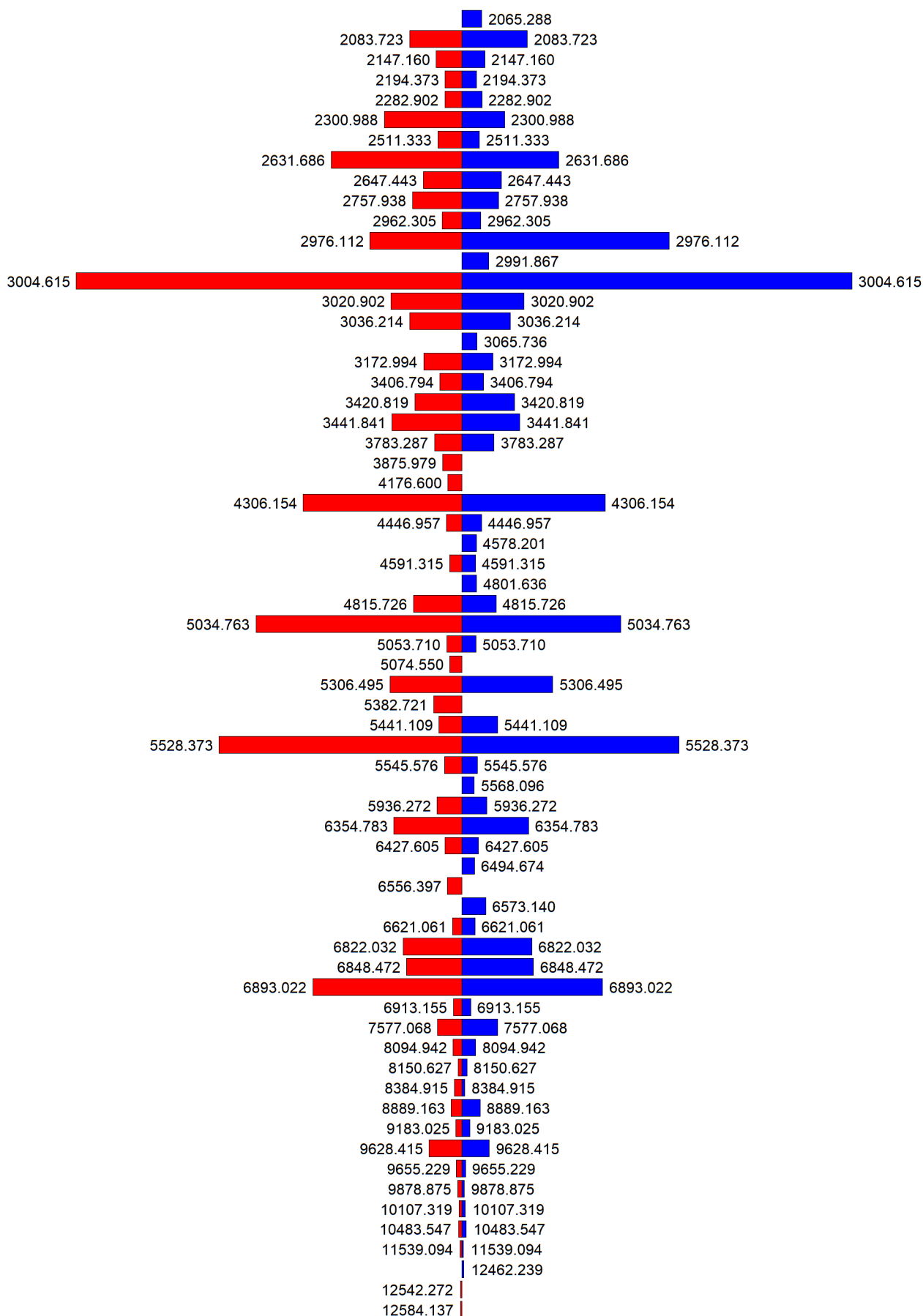


Рис. 2 Сравнение пиковых значений усредненных спектров устойчивого (красный) и чувствительного (синий) штаммов *S. aureus*

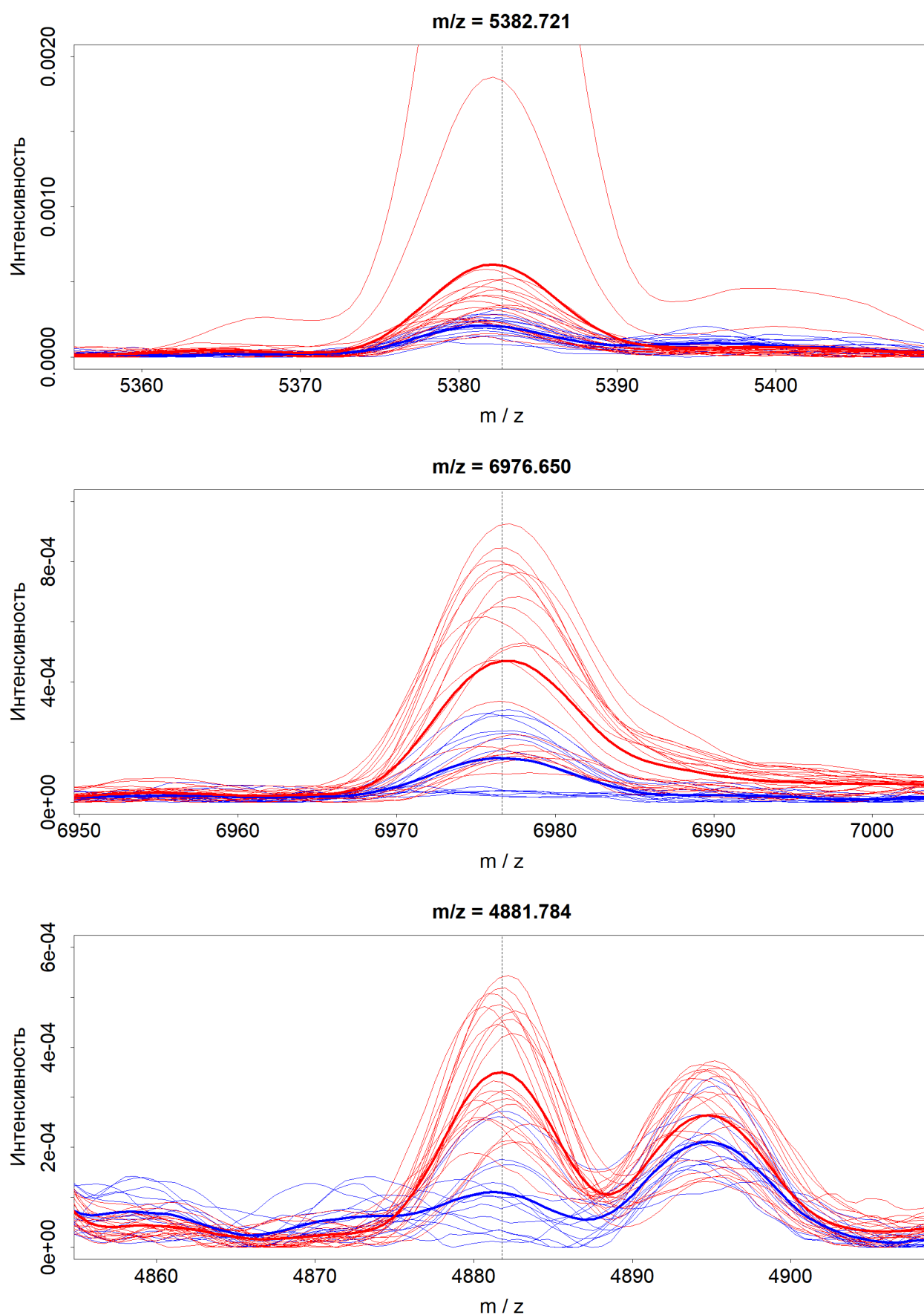


Рис. 3 а,б,в — Области масс-спектров *P.aeruginosa* вероятно ответственные за устойчивость к антибиотикам. Красная линия — устойчивый штамм, синяя линия — чувствительный штамм, толстая линия — усредненный спектр.

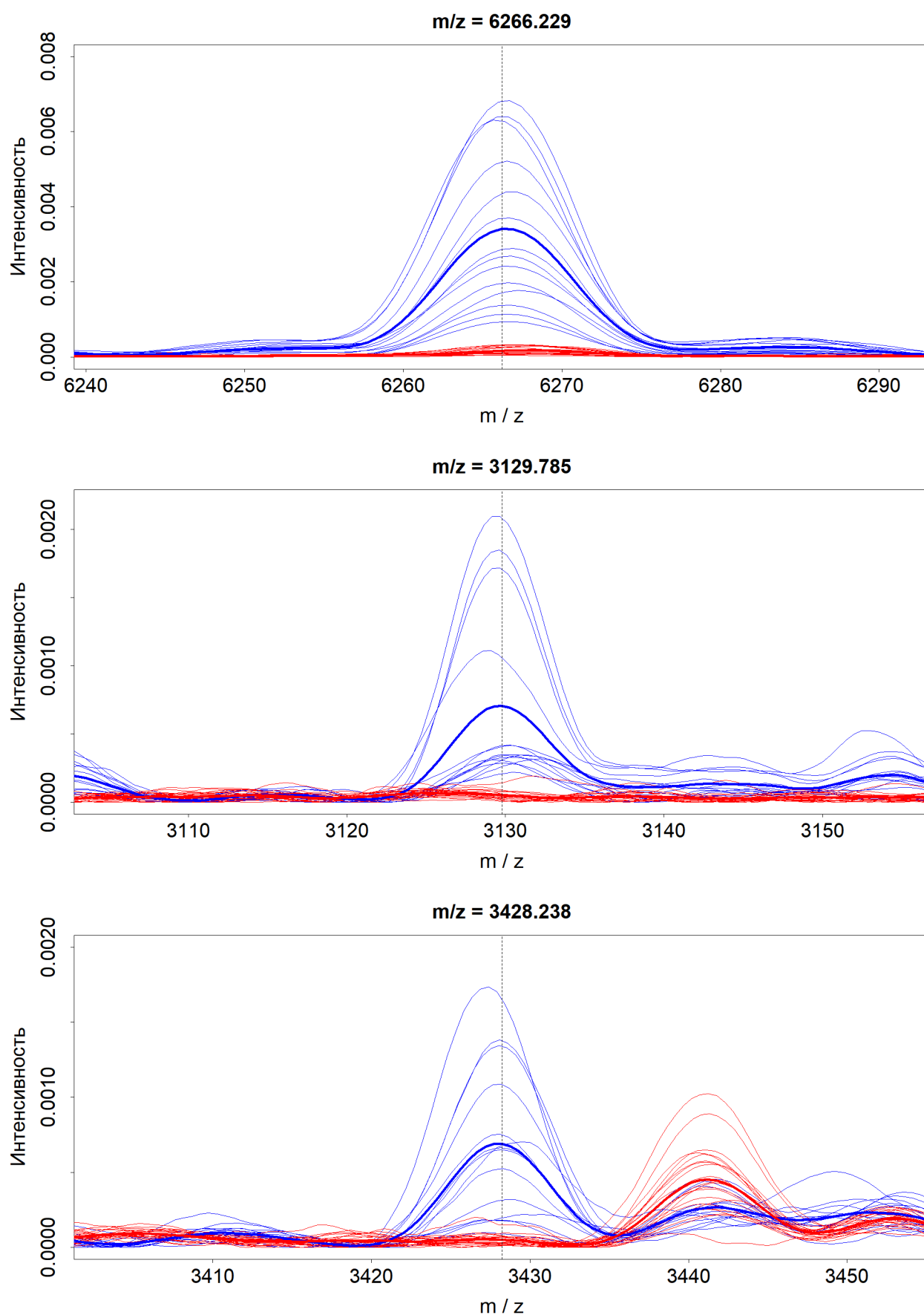


Рис. 4 а,б,в — Области масс-спектров *P. aeruginosa* вероятно ответственные за чувствительность к антибиотикам. Красная линия — устойчивый штамм, синяя линия — чувствительный штамм, толстая линия — усредненный спектр.

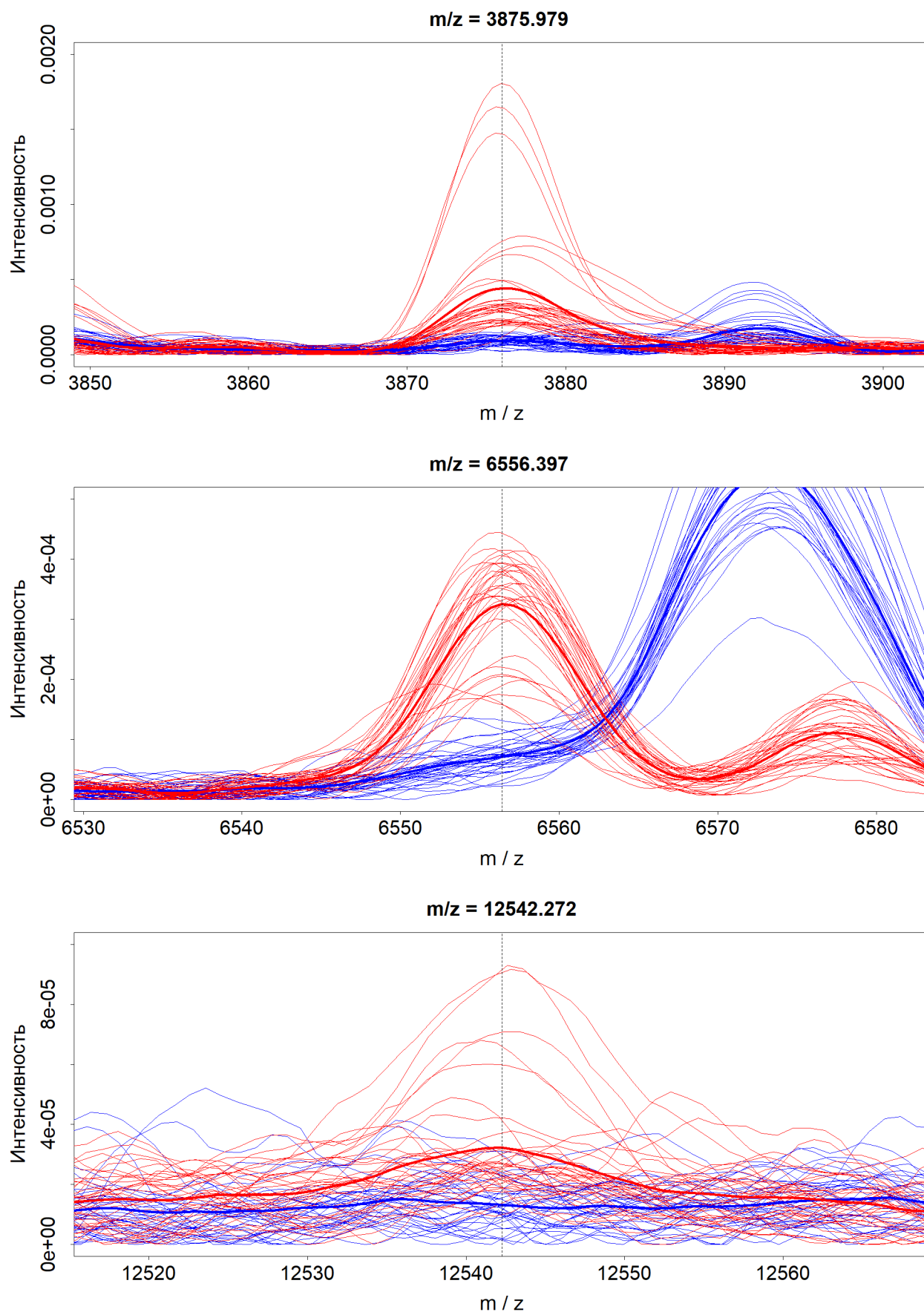


Рис. 5 а,б,в — Области масс-спектров *S. aureus* вероятно ответственные за устойчивость к антибиотикам. Красная линия — устойчивый штамм, синяя линия — чувствительный штамм, толстая линия — усредненный спектр.

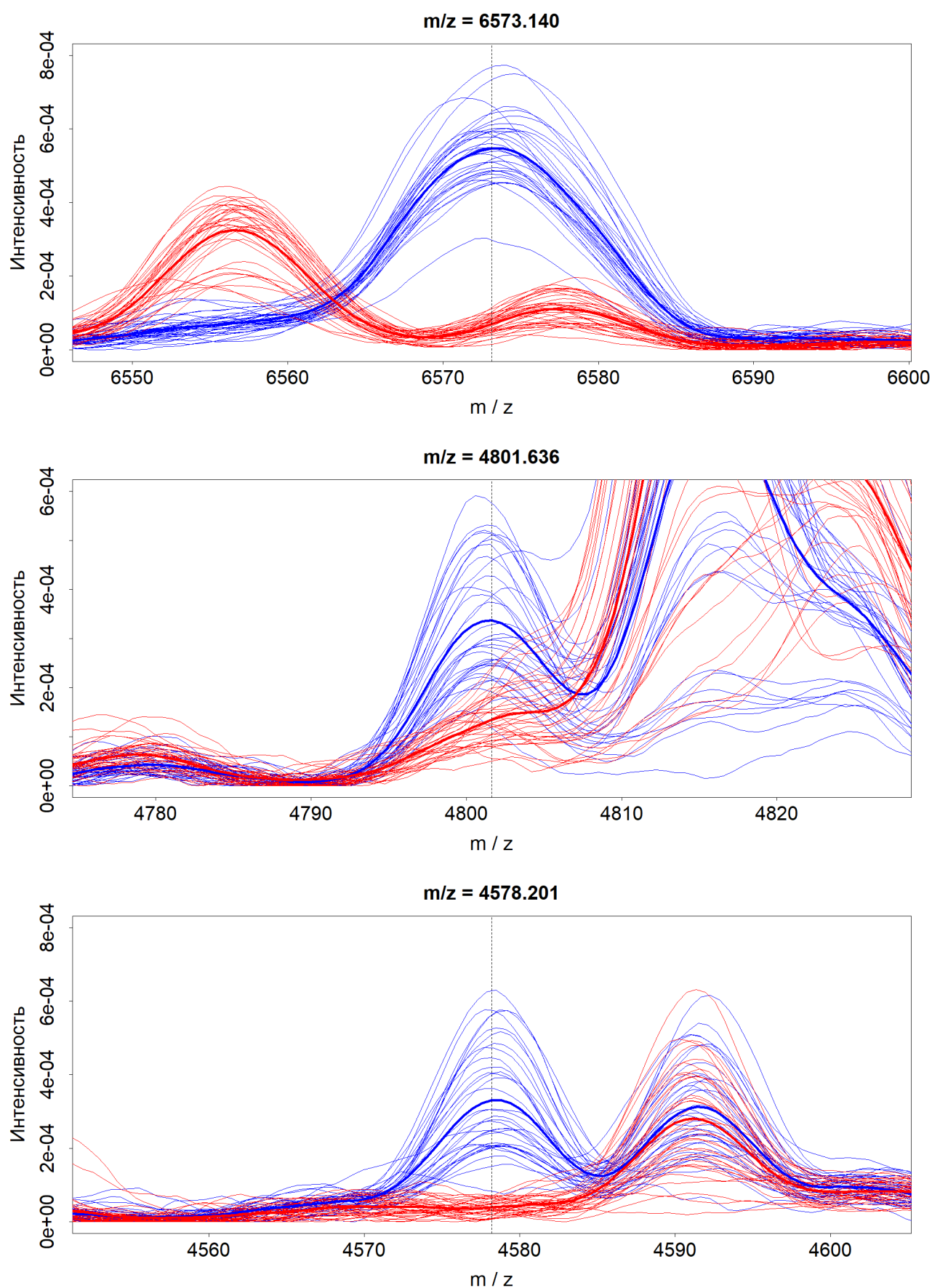


Рис. 6 а,б,в — Области масс-спектров *S. aureus* вероятно ответственные за чувствительность к антибиотикам. Красная линия — устойчивый штамм, синяя линия — чувствительный штамм, толстая линия — усредненный спектр.

Заключение. Гипотетически присутствие на масс-спектрах устойчивых к антибиотикам культур пиков, отсутствующих у культур чувствительных к этим же антибактериальным препаратам позволяет предложить метод масс-спектрометрии для изучения их антибиотикорезистентности. Однако, у чувствительных к антибактериальным препаратам бактерий были выявлены пики, не обнаруженные у устойчивых штаммов. Вполне возможно, что отслежена ситуация, когда один и тот же фермент отвечает за метаболическую функцию и функцию резистентности к факторам агрессии, что было отслежено на генетическом уровне. [12]. Количество пиков на масс-спектрах антибиотикорезистентных штаммов, скорее всего, может оказаться как большим так и меньшим по сравнению с антибиотикочувствительными штаммами.

В настоящее время рассматривается возможность уточнения полученных результатов путем проведения аналогичных исследований в отношении других штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

Литература

1. Голошва Е.В., Алешукина А.В., Твердохлебова Т.И. Циркуляция антибиотикорезистентных неферментирующих бактерий в Ростове-на-Дону. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2019;9(2):52-55.
2. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И. и др. Основы современной классификации инфекций, связанных с медицинской помощью. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2011;(3):4.
3. Baquero F., Alvarez-Ortega C., Martinez J.L. Ecology and evolution of antibiotic resistance. Environ Microbiol Reports. 2009;1(6):469-476.
4. Стяжкина С.Н., Кузьяев М.В., Кузьяева Е.М. и др. Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов в клинической больнице. Международный студенческий научный вестник. 2017;(1):4. URL: eduherald.ru/ru/article/view?id=16807
5. Aminov R.I. The role of antibiotic and antibiotic resistance in nature. Environ Microbiol Reports. 2009;11(12):2970-2988.
6. Бондаренко В.М., Вертиев Ю.И.. Факторы патогенности и токсигенности микроорганизмов. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. М: «БИНОМ», 2008. К.1 Гл.4. С. 422-447.
7. Миндлин С.З., Петрова М.А., Басс И.А. и др. Происхождение эволюция и миграция генов лекарственной устойчивости. Генетика. 2006;42(11):1145-1511.
8. Царёв В.Н., Ипполитов Е.В., Николаева Е.Н. Генетические маркеры резистенции к антибиотикам у биопленкообразующих штаммов возбудителей анаэробной инфекции. Национальные приоритеты России, 2016;20(2):136-141. URL: cyberleninka.ru/article/n/geneticheskie-markery-rezistentnosti-k-antibiotikam-u-bioplennyok-formiruyuschih-shtammy-vozbuditeley-anaerobnoy-infektsii
9. Гордеев А.Б., Любасовская Л.А., Родченко Ю.В. и др. Генетический полиморфизм госпитальных штаммов *Staphylococcus epidermidis*, выделенных у новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2017;(1):26-32. URL: cyberleninka.ru/article/n/geneticheskiy-polimorfizm-gospitalnyh-shtammy-staphylococcus-epidermidis-vydelennyh-u-novorozhdennyh-otdeleniya-reanimatsii-i
10. Gibb S., Strimmer K. Mass Spectrometry Analysis Using MALDIquant. Statistical Analysis of Proteomics, Metabolomics, and Lipidomics Data Using Mass Spectrometry. 2017. P. 101-124.
11. Gibb S., Strimmer K. MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. Bioinformatics. 2012. P. 2270-2271.
12. Piepersberg W., Distler J., Henzel P. et al. Antibiotic resistance by modification: many resistance genes could be derived from cellular control genes in actinomycetes. A hypothesis. Actinomycetologica 1988;(2):83-89.

Сведения об ответственном авторе:

Алешукина Анна Валентиновна — доктор медицинских наук, руководитель лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора,
e-mail: aaleshukina@mail.ru