

Литература

1. Мещерякова И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – № 2 (51). – С. 17-22.
2. Олсуфьев Н.Г., Емельянова О.С., Угловой Г.П., и др. Сравнительные испытания на людях вариантов вакцинного туляремийного штамма 15 Гайского // Журн. микробиол. и иммунобиол. – 1971. – № 5. – С. 55-57.
3. Профилактика туляремии. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 3.1.7.2642-10 // Бюлл. норм. и метод. документов Госсанэпиднадзора. – 2010. – Вып. 3. – С. 15-35.

Ответственный автор

Саяпина Лидия Васильевна – Главный эксперт ФГУБ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения России докт. мед. наук/
Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 579.841.93Brucella-07

ПРИМЕНЕНИЕ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *BRUCELLA SPP.*

Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, С.И. Головнева, Е.В. Чеботарева
ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь

Разработан проект пополняемой электронной базы данных масс-спектрометрических белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI Biotyper v 3.0 (Bruker Daltonics, США). На основании анализа репрезентативных масс-спектров 39 штаммов бруцелл выявлены 12 возможных родоспецифичных фрагментов в диапазоне масс 2000 – 20000 Да.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, белковое профилирование, возбудитель бруцеллеза.

APPLICATION OF MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY TO BRUCELLA SPP. IDENTIFICATION

D.V. Ulshina, D.A. Kovalev, S.I. Golovneva, E.V. Chebotareva
Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol

The project of refillable electronic database of mass spectrometric protein profiles of brucellosis strains in the environment of the program MALDI Biotyper v 3.0 (Bruker Daltonics, USA) has been developed. On the basis of analysis of representative mass spectra of 39 Brucella strains, 12 possible genus-specific fragments in the mass range 2000 - 20000 Da were identified.

Key words: mass spectrometry, protein profiling, brucellosis causative agent.

Одним из перспективных современных методов идентификации и дифференциации бактерий является времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS), основанная на исследовании специфичных белковых профилей отдельных микроорганизмов [1]. Исходя из возможных угроз здоровью населения, актуальной задачей является разработка эффективного стандартизированного метода экспресс-идентификации возбудителя бруцеллеза с использованием MALDI-TOF MS.

Основными преимуществами использования MALDI-TOF масс-спектрометрии по сравнению с

классическими методами идентификации микроорганизмов являются: высокая точность дифференциации до вида (до 99 %), специфичность (97,6 %), экспрессность, низкая стоимость и возможность автоматизации анализа [3].

В настоящее время созданы базы данных белковых профилей большинства патогенных микроорганизмов для рутинной лабораторной идентификации с использованием соответствующего масс-спектрометра. Однако имеющаяся информация о протеомных профилях *Brucella spp.* не включена в большинство доступных баз данных, что определяет необходимость получения качественных масс-спектров референсных штаммов бруцелл для создания современной системы детекции и идентификации возбудителя с помощью масс-спектрометрии.

Цель работы – разработка проекта пополняемой электронной базы данных масс-спектрометрических белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза и поиск родоспецифичных фрагментов в области 2000-20000 Да на масс-спектрах бруцелл.

Материалы и методы

Обеззараживание и подготовку проб культур возбудителя бруцеллеза проводили по методике, описанной ранее Lista et al. [2], в который в ходе исследования были внесены незначительные модификации.

В работе использованы 39 штаммов бруцелл пяти основных патогенных видов (*Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*), 13 из которых являются референтными. Масс-спектры получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, США) при следующих параметрах: частота лазера 60 Гц, интенсивность лазера 10-50 %, 110 нс PIE, напряжение первого источника ионов 19,4 kV, второго – 17,3 kV, напряжение линзы 8 kV, напряжение линейного детектора 2,500 kV, диапазон масс 2000-20000 Да. Суммарный масс-спектр генерировали из 20 случайно выбранных позиций каждой капли мишени (всего по 4000 выстрелов лазера). Перед каждой серией анализов проводили внутреннюю калибровку с использованием бактериального тест-стандарта MBT (Bruker Daltonics, США). Сбор исходных данных с формированием масс-спектров проводили в программах Bruker Daltonics flexControl v 3.3.64, предварительный анализ спектров – flexAnalysis v 3.3.65. Визуализацию и анализ полученных масс-спектров проводили в программе mMass v 5.5.0.

Нами были получены 859 масс-спектров для 39 исследуемых штаммов бруцелл. Из полученной коллекции были отобраны репрезентативные масс-спектры для каждого штамма с целью дальнейшего включения в проект электронной базы данных в среде программы MALDI Biotyper v 3.0 (Bruker Daltonics, США).

Анализ спектров в базе данных Biotyper DB v 3.1.2 показал низкие значения показателя score (менее 1,397) для всех штаммов возбудителя бруцеллеза относительно других микроорганизмов (4613 референсных масс-спектров), что позволяет сделать вывод об уникальности исследуемых белковых профилей. С другой стороны, сравнение коллекции масс-спектров штаммов бруцелл между собой подтвердило высокую степень родства изучаемых бактерий (score в интервале 1,946-2,845).

Сравнительный анализ совокупности пиков на полученных масс-спектрах позволяет предположить существование набора родоспецифичных фрагментов в интервале масс 2000-20000 Да. На всех изученных спектрах установлено наличие 12 идентичных сигналов, отличающихся по интенсивности и имеющих следующие значения m/z (± 3 Da): 2422, 2581, 3023, 3336, 3523, 3754, 4542, 5170, 6672, 7048, 9080, 16068. Вероятно, по наличию указанного комплекса специфичных фрагментов можно определить принадлежность исследуемого микроорганизма к роду *Brucella*. Нами планируется проверить это предположение при изучении достаточного количества проб культур бруцелл с помощью описанного метода.

Заключение

Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что MALDI-TOF MS позволяет быстро проводить идентификацию бруцелл на уровне рода и, в ряде случаев, дифференциацию до уровня штамма. Для эффективного применения метода необходимо создание представительной электронной базы данных масс-спектров коллекционных штаммов бруцелл. Не менее актуальным является поиск и отбор родо-, видо- и штаммоспецифичных маркерных фрагментов, наличие которых в масс-спектрах позволит эффективно проводить идентификацию и типирование возбудителя бруцеллеза в пробе.

Литература

1. Ferreira L., Vega S., Sanchez-Juanes F. et al. Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Comparison with routine methods used in clinical microbiology laboratories // *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* – 2010. – Vol. 28. – P. 492-497.

2. Lista F., Reubsaet FA, De Santis R et al. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. BMC Microbiology. – 2011. – Vol. 11. – P. 267.
3. Veen S., Claas E., Kuijper E. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48. – P. 900-907.

Ответственный автор

Ульшина Диана Васильевна – младший научный сотрудник подготовки специалистов ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 577:579.852.11B.anth

ПРОДУКЦИЯ БЕЛКОВ S-СЛОЯ И ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА РАЗЛИЧНЫМИ ШТАММАМИ *BACILLUS ANTHRACIS*

**А.М. Барков, А.В. Новоженина, И.А. Баркова,
С.В. Порожня, Г.А. Ткаченко, А.В. Липницкий**
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, Волгоград

*Изучена продукция белков изогенными вариантами штаммов *Bacillus anthracis* с различным набором плазмид вирулентности. Показано, что однотипные варианты штаммов различаются по продукции белков S-слоя и протективного антигена, что следует учитывать при отборе штаммов-продуцентов.*

Ключевые слова: изогенные варианты штаммов *Bacillus anthracis*, реакция иммунодиффузии с растущими культурами (РИДПК), электрофорез, гель-хроматография.

PRODUCTION OF S-LAYER PROTEINS AND PROTECTIVE ANTIGEN BY DIFFERENT *BACILLUS ANTHRACIS* STRAINS

A.M. Barkov, A.V. Novozhenina, I.A. Barkova, S.V. Porohnya, G.A. Tkachenko, A.V. Lipnitsky
Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd

*In this paper we studied protein production by *Bacillus anthracis* isogenic variants with different set of virulence plasmids. It was shown that homotypic strains differed by S-layer protein and protective antigen production that should be taken into account in the selection of producer strains.*

Key words: isogenic *Bacillus anthracis* variants, immunodiffusion with growing cultures (IDGC), electrophoresis, gel-chromatography.

Предметом протеомных исследований является сравнительный анализ секреции белков *Bacillus anthracis*, поиск иммунодоминантных антигенов, что может иметь значение при определении патогенности, терапевтических и диагностических маркеров, разработке вакцин. Для этого исследователями были использованы изогенные варианты штаммов возбудителя сибирской язвы, с различным содержанием плазмид вирулентности, выращенные в определенных условиях [2, 3, 8]. В предыдущих исследованиях нами получены сыворотки, содержащие антитела преимущественно к одному из белков S-слоя или протективному антигену (ПА), что позволило проводить внутривидовую дифференциацию штаммов [1, 2].