

- вершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями. Бактериология. 2016, 1 (1): 88-94.
3. Кудрявцева Т.Ю., Транквиловский Д.В., Мокриевич А.Н., Попов В.П., Морозова Н.С., Зароченцев М.В., Мазепа А.В., Окунев Л.П., Холин А.В., Косилко С.А., Федоров Ю.М., Храмов М.В., Дятлов И.А. Эпизоотическая и эпидемическая ситуации по туляремии в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 1: 28-32.
 4. Куница Т.Н., Избанова У.А., Мека-Меченко В.Г., Майканов Н.С., Садовская В.П. Эпизоотическая активность природных очагов туляремии Казахстана на приграничной с Россией территории. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2014, 25: 63-65.
 5. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев (ред.). М., Шико, 2013.
 6. Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Губарева Т.И., Павлов В.М., Дятлов И.А. Выделение среднеазиатского подвида туляреминого микроба на территории Алтайского края. Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 1: 66-69.
 7. Long G.W., Oprandy J.J., Narayanan R.B. et al. Detection of Francisella tularensis in blood by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1993, 31 (1): 152-154.
 8. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C. et al. A Francisella tularensis pathogenicity island required for intramacrophage growth. J. Bacteriol. 2004, 186: 6430-6436.

Поступила 25.12.16

Контактная информация: Балахонов С.В.,
664002, Иркутск, ул. Трилиссера, 78, р. т. (3952)23-99-85

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Д.В.Ульшина, Д.А.Ковалев, Д.Г.Пономаренко, Д.В.Русанова,
Н.М.Швецова, Т.В.Таран, И.В.Кузнецова, А.М.Жиров,
А.А.Хачатурова, И.Ю.Борздова, А.Н.Куличенко*

ПРИМЕНЕНИЕ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА В ОБРАЗЦАХ КРОВИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Изучение возможности применения метода времяпролетной масс-спектрометрии для выявления возбудителя бруцеллеза в крови. *Материалы и методы.* Штаммы бруцелл: 5 *Brucella melitensis* и 21 *Brucella abortus*. Белковое профилирование в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex «Bruker Daltonics». *Результаты.* Модифицирована и оптимизирована методика обеззараживания и пробоподготовки образцов крови, контаминированной бруцеллами, для анализа методом MALDI-TOF MS. Получены 120 репрезентативных белковых профилей экстрактов образцов крови, содержащей возбудитель бруцеллеза. Сформирован и проанализирован результирующий пик-лист (супер-спектр) исследуемой белковой фракции экстракта крови условно здорового человека в пределах исследуемой группы. *Заключение.* Предложена схема выявления бруцелл в образцах крови методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, основанная на выявлении комплекса 15 родоспецифичных фрагментов. Охарактеризованы сигналы на масс-спектрах экстрактов лейкоцитарной фракции крови, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 9—17

Ключевые слова: возбудитель бруцеллеза, кровь, масс-спектрометрия, белковое профилирование, выявление

D.V. Ulshina, D.A. Kovalev, D.G. Ponomarenko, D.V. Rusanova,
N.M. Shvetsova, T.V. Taran, I.V. Kuznetsova, A.M. Zhirov,
A.A. Khachaturova, I.Yu. Borzdova, A.N. Kulichenko

APPLICATION OF TIME-OF-FLIGHT MASS-SPECTROMETRY FOR DETECTION OF CAUSATIVE AGENT OF BRUCELLOSIS IN BLOOD SAMPLES IN EXPERIMENT

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. Study the possibility to apply time-of-flight mass-spectrometry for detection of causative agent of brucellosis in blood. *Materials and methods.* Brucella strains: 5 *Brucella melitensis* and 21 *Brucella abortus*. Protein profiling in linear mode on MALDI-TOF mass-spectrometer Microflex «Bruker Daltonics». *Results.* Technique for disinfection and preparation of blood samples was modified and optimized for MALDI-TOF MS analysis. 120 representative protein profiles of sera extract were obtained that contain brucellosis causative agent. A resulting peak-list (super-spectrum) of the studied protein fraction of blood extract of a conditionally healthy human within the studied group was formed and analyzed. *Conclusion.* A scheme of brucella detection in blood samples by MALDI-TOF MS is proposed, based on detection of a complex of 15 genus-specific fragments. Signals on mass-spectra of extracts of leukocyte fraction of blood, artificially contaminated with brucellosis causative agents are characterized.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 9–17

Key words: brucellosis causative agent, blood, mass-spectrometry, protein profiling, detection

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы рода *Brucella* — факультативные внутриклеточные бактерии, вызывающие зоонозное инфекционно-аллергическое заболевание, имеющее тенденцию к хроническому течению. По данным Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, в Российской Федерации отмечено ежегодное увеличение числа больных бруцеллезом сельскохозяйственных животных и неблагополучных пунктов по бруцеллезу крупного (КРС) и мелкого (МРС) рогатого скота [2]. В свою очередь, эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу определяется неблагополучной эпизоотической обстановкой.

В последнее десятилетие помимо традиционных методов идентификации чистых культур бактерий (бактериологические, иммуно-серологические), используют молекулярно-генетические подходы, которые значительно расширяют возможности лабораторной диагностики инфекций, позволяя осуществлять прямое определение ДНК патогена в анализируемом материале [14]. Кроме того, наблюдается интеграция MALDI-TOF масс-спектрометрии (МС) в систему традиционных схем индикации и идентификации бруцелл [6, 8].

Одно из активно развивающихся направлений протеомных исследований — изучение возможности применения MALDI-TOF MS для выявления возбудителей инфекционных болезней, в том числе бруцелл, в клинических или иных контаминированных образцах без этапа выделения чистой культуры на стадии пробоподготовки [5]. Однако отсутствие регламентированных методик обеззараживания и подготовки исследуемых проб, а также универсального программного обеспечения для анализа клинических образцов методом MALDI-TOF MS является основной причиной относительно низкой воспроизводимости результатов масс-спектрометрии [4, 7, 10]. Метод MALDI-TOF

MS для исследования клинических образцов на наличие патогенов имеет ряд ограничений, которые связаны, в том числе, с низкой концентрацией возбудителя в материале [1, 13]. Сложность интерпретации полученных MALDI-TOF MS масс-спектров при анализе клинических образцов обусловлена существенной вариабельностью качественного и количественного состава белковых профилей аналитов, полученных от различных индивидуумов. В качестве эффективного решения указанной проблемы исследователями предложены различные способы предварительной подготовки проб: концентрирование, фракционирование, удаление мажорных фракций белков, селективное удаление небелковых примесей и др. [11].

Ранее нами была предложена схема идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF MS, основанная на выявлении группы родоспецифичных фрагментов в диапазоне масс 2000 — 20000 Da (m/z (± 5 Da): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068 [3]. Возможность применения этого подхода для выявления возбудителя бруцеллеза в клинических образцах не изучена.

Цель работы — оценка эффективности алгоритма выявления возбудителя бруцеллеза в искусственно контаминированных образцах крови с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Для реализации поставленной цели проведен MALDI-TOF MS анализ белковых экстрактов проб крови человека, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза (модельные образцы крови), изучена эффективность разработанного нами алгоритма выявления бруцелл в модельных образцах крови, основанного на определении бруцелла-специфичных биомаркеров в белковых экстрактах с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 26 культур бруцелл из коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института: *B. abortus* 19 BA, 544, 1552, 870, C-68, 63-75, B-3196, Tulya, C-548, C-549, C-550, 19, C-497, C-551, C-499, 42, 381, 385, 390, 403, 420; *B. melitensis* 16-M, 63/9, 548, C-554, Rev-1.

В качестве объекта исследования использовали стабилизированную гепарином венозную кровь 30 условно здоровых человек (15 мужчин и 15 женщин в возрасте от 20 до 60 лет). Кровь отбирали в емкости для взятия венозной крови Vacutainer (Becton Dickinson International, США).

Питательные среды, реактивы: вода ультрачистая (тип I по ASTM) (систему Milli-Q, Millipore, США), деионизированная вода, спирт этиловый 96% (ГОСТ Р 51723-2001), кислота муравьиная ~98% (Sigma-Aldrich, США), ацетонитрил (степень чистоты «для ВЭЖХ-МС») (Sigma-Aldrich, США), α -циано-4-гидроксикоричная кислота (степень чистоты «для МС») (Sigma-Aldrich, США), трифтороуксусная кислота >99% (Sigma-Aldrich, США), бактериальный тест-стандарт МВТ для внутренней калибровки масс-спектрометра (Bruker Daltonics, Германия). Культуры возбудителя бруцеллеза были выращены на агаре Альбими (производитель — Ставропольский противочумный институт), показатели качества: рН 7,2 — 7,4, прочность 300 — 380 г по Валенту, содержание аминного азота 100 — 120 мг %).

Одну бактериологическую петлю 48-часовой культуры бруцелл, выращенной на плотной питательной среде (бруцелла-агар), эмульгировали в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида, затем по 1 мл приготовленной суспензии переносили в вакутейнеры со стабилизированной кровью объемом 3 мл, свободной от бруцеллезного инфекта. Искусственно контаминированные

бруцеллами образцы крови инкубировали 48 часов при 37°C. Аликвоту полученной взвеси объемом 2 мл центрифугировали при 2000 об/мин в течение 2 мин, полученную надосадочную жидкость удаляли. В дальнейшей работе использовали осадок, содержащий форменные элементы крови. Для удаления (лизиса) эритроцитов осадок разбавляли деионизированной водой в 10 раз, инкубировали 10 мин. Центрифугировали 3 мин при 2000 об/мин, супернатант удаляли. Процедуру повторяли до полного удаления эритроцитов. Суспензию отмытых лейкоцитов переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 — 2 мл и центрифугировали при 15 500 об/мин 10 мин, супернатант удаляли.

Все этапы работы с культурами возбудителя бруцеллеза проводили в боксе биологической безопасности класса III или II-B.

Обеззараживание образцов, содержащих возбудитель бруцеллеза, проводили раствором 70% этилового спирта по ранее описанной методике [9]. Часть полученного осадка использовали для проверки на специфическую стерильность.

Для достижения соблюдения одинаковых условий с модельными образцами крови интактные пробы объемом 4 мл инкубировали при 37°C в течение 48 ч, после чего центрифугировали при 2000 об/мин 30 сек. Супернатант отбирали в пробирки типа эппендорф и центрифугировали при 15 500 об/мин 5 мин, затем осадок промывали деионизированной водой. Полученные белковые экстракты использовали в качестве отрицательного контроля.

Во время проведения теста на специфическую стерильность полученные образцы хранились при температуре минус 18 — 20°C, затем использовались для MALDI-TOF MS исследования.

Приготовленные белковые экстракты наносили на ячейки стального планшета для MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Германия) в объеме 1 мкл. Планшет сушили на открытом воздухе в течение нескольких минут с последующим наслоением поверх раствора матрицы, состоящего из α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в растворе, содержащем 500 мкл ацетонитрила, 475 мкл ультрачистой воды и 25 мкл трифторуксусной кислоты. Плашку высушивали на воздухе до образования кристаллов в течение 5 мин. Масс-спектры получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия) при следующих параметрах: частота лазера 60 Гц, интенсивность лазера 10 — 50%, время задержки экстракции 110 нс P1E, напряжение первого источника ионов 19,4 kV, второго — 17,3 kV, напряжение фокусирующей линзы 8 kV, напряжение линейного детектора 2,500 kV, диапазон масс 2000 — 20 000 Da. Внутреннюю калибровку ранее указанного диапазона проводили с использованием точных значений масс бактериального тест-стандарта MBT (Bruker Daltonics, Германия). Суммарный масс-спектр генерировали из 20 случайно выбранных позиций каждой капли мишени (всего по 4000 выстрелов лазера). Для управления масс-спектрометром, включая установку режимов работы и регистрации масс-спектров, использовали программный пакет Daltonics flexControl v 3.3.64 (Bruker Daltonics, Германия), визуализацию и анализ полученных масс-спектров проводили в программе — flexAnalysis v 3.3.65. Формирование таблиц выполняли с использованием программных ресурсов пакета Microsoft Office 2010.

Для математико-статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica v 10.0 (Statsoft Inc., США). Анализ групповых

различий оценивали по t-критерию Стьюдента для несвязанных выборок при 95% уровне значимости. Различия между выборками считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

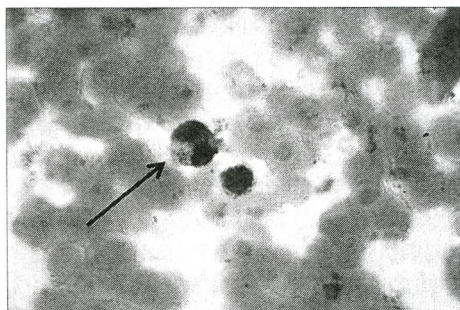
В ходе настоящего исследования использовали 30 проб крови человека. Из каждой пробы параллельно готовили три образца в двух повторах: 1, 2 — искусственно контаминировали культурой *B. melitensis* или *B. abortus*, 3 — использовали для получения белковых профилей интактной крови. Всего было исследовано 120 образцов, для каждого из которых получали не менее 30 масс-спектров с последующим формированием суммарного спектра образца. Наиболее репрезентативные спектры использовали для сравнительного анализа полученных данных. Воспроизводимость белковых профилей модельных образцов была подтверждена серией повторных измерений. При проведении масс-спектрометрического анализа проб, хранившихся до 3 сут при температуре минус 18 — 20°C, изменений основных характеристик сигналов масс-спектров не выявлено.

Ранее нами был предложен комплекс параметров для оценки качества масс-спектров чистых культур возбудителя бруцеллеза [3]. Учитывая особенности качественного и количественного состава сигналов масс-спектров экстрактов модельных образцов крови, а также экспериментальные данные, полученные в рамках настоящей работы, нами были приняты следующие параметры валидных масс-спектров: абсолютная интенсивность пиков $I > 300$, разрешение $R > 150$, общее число идентифицированных пиков от 65 до 100, отношение сигнал/шум — 10/1.

В результате инкубации искусственно контаминированной бруцеллами крови в образце достигалась необходимая концентрация бактериальных клеток для проведения MALDI-TOF MS анализа. Конечная концентрация бактерий в крови составляла около 1×10^4 м.к./мл.

Из научных источников известно, что благодаря фагоцитозу бактериальных клеток микро- и макрофагами крови, бруцеллы локализуются преимущественно в лейкоцитах [12]. На рис. представлена полученная в ходе настоящего исследования микрофотография, иллюстрирующая фагоцитоз бруцелл в мазке крови, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза.

При масс-спектрометрическом анализе модельных образцов крови, содержащих бруцеллы, Ferreira L. et al. предложили удалять в процессе пробоподготовки лейкоциты многократным центрифугированием и для последующего MALDI-TOF MS использовать полученный супернатант [5]. Учитывая внутриклеточную локализацию возбудителя бруцеллеза, по нашему мнению, целесообразно использовать в качестве образца для выявления микроорганизма белковый экстракт лейкоцитарной фракции крови. Для сравнительной оценки указанных вариантов пробоподготовки в ходе исследования



Мазок крови, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза. Фагоцитоз бруцелл (стрелка).

Окраска азуром-II, $\times 1000$ (микроскоп Nikon Eclipse E200, Япония; окуляр 10x (F.O.V. 20); объектив 100x1,25).

параллельно проводили MALDI-TOF MS анализ супернатанта и лейкоцитарной фракции образцов модельных образцов крови. При этом было установлено, что пик-листы масс-спектров лейкоцитарной фракции, как правило, более представительны (в среднем на $20 \pm 2\%$), что может быть связано с чрезвычайно низкой концентрацией клеток возбудителя в полученном после центрифугирования супернатанте. Кроме того, интенсивность родоспецифичных фрагментов бруцелл на 30 — 40% превосходила аналогичные сигналы на масс-спектрах, полученных из сыворотки крови. Таким образом, использование белковых экстрактов лейкоцитарной фракции представляется более предпочтительным по сравнению с супернатантом при выявлении возбудителя бруцеллеза в крови методом MALDI-TOF MS.

Основное количество зарегистрированных пиков на масс-спектрах белковых экстрактов крови человека было локализовано в интервале значений масс 2300 — 16 100 Da рабочей области и составило 80 ± 10 . На всех масс-спектрах встречались гомологичные сигналы, отличающиеся по абсолютной интенсивности ($m/z \pm 5$ Da): 2581, 3268, 3352, 3372, 3440, 3467, 3486, 3508, 3613, 3711, 4230, 5226, 5290, 5422, 5674, 5935, 6345, 6576, 7090, 7353, 7570, 7935, 9414, 10088, 10442, 10830, 11100, 15131, 15866. В ходе работы были отмечены изменения количественных и качественных характеристик на масс-спектрах крови человека для указанных гомологичных сигналов: интенсивность — от 314 до 9533 a.i., разрешение пиков — от 157 до 2141, отношение сигнал/шум — от 10/1 до 30/1, ширина пика на полувысоте — от 7 до 375. При этом общие сигналы ($m/z \pm 5$ Da): 2576, 3263 были обозначены ранее как потенциально специфичные для микроорганизмов рода *Brucella* [9]. Кроме того, следует отметить, что наибольшая относительная интенсивность на всех спектрах была характерна для фрагментов ($m/z \pm 5$ Da): 3372, 3440, 3486, 5674, 6345, 7090, 7935. В то же время, масс-спектры отдельных образцов содержали единичные сигналы ($m/z \pm 5$ Da): 3533, 4062, 4593, 5156, 8123, 10031, что может быть следствием присутствия в исследуемом экстракте переменных белковых фрагментов. Полученные данные масс-спектрометрического анализа белковых экстрактов крови условно здоровых людей были использованы при формировании результирующего пик-листа (супер-спектра).

Результаты подтверждают, что состав протеома крови человека динамичен и может изменяться в зависимости от текущих условий жизнедеятельности и состояния здоровья. Помимо присутствующих различий протеомного профиля крови у разных индивидуумов и его естественных изменений во времени, существуют вариации количественного и качественного набора белков, связанные с адаптивным ответом на изменение внешних условий. Также известно, что на белковый состав крови могут оказывать влияние различные факторы, в том числе питание, физическая активность, хронические заболевания и т.д. То есть, протеом человека в отличие от генома является ситуационным [Corzett T.H. et al., 2010]. Следовательно, возможные изменения белкового состава крови у различных индивидуумов будут сопровождаться появлением или элиминированием некоторых белков, m/z которых может совпасть с таковыми бруцелл. В связи с этим, при выявлении возбудителя бруцеллеза в клинических образцах, а также в крови методом MALDI-TOF MS важно учитывать переменность белкового состава исследуемого биоматериала.

Таким образом, MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ экстрактов крови человека позволил выявить неспецифичные фрагменты ($m/z \pm 5$ Da): 2581, 3268, ранее используемые в схеме родовой идентификации культур воз-

будителя бруцеллеза. Учитывая состав белковых профилей крови человека и культур штаммов возбудителя бруцеллеза с одинаковым значением m/z , для выявления бруцелл в модельных и клинических образцах крови нами предложена схема анализа, включающая поиск 15 специфических фрагментов на соответствующих масс-спектрах ($m/z \pm 5$ Da): 2422, 3025, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068. Специфичность каждого из указанных сигналов будет уточнена в ходе дальнейших исследований, однако на основании присутствия всех 15 аналитически значимых сигналов на соответствующем спектре можно судить о наличии бруцелл в исследуемом образце.

На следующем этапе работы был осуществлен MALDI-TOF MS анализ экстрактов модельных образцов крови. При этом было определено, что основное количество зарегистрированных сигналов на масс-спектрах экстрактов образцов контаминированной возбудителем бруцеллеза крови человека локализуется в интервале значений масс 2300 — 16 100 Da и составляет 80 ± 10 . Белковые профили всех исследуемых модельных образцов гемокультур содержали общие сигналы ($m/z (\pm 5$ Da)): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3372, 3440, 3467, 3523, 3696, 3754, 4410, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6217, 6284, 6345, 6672, 7048, 7394, 7513, 7567, 7765, 7938, 9085, 15129, 16068. При этом интенсивность указанных фрагментов находилась в диапазоне от 2022 до 19541 a.i., разрешение — от 292 до 629, отношение сигнал/шум — от 10/1 до 21/1, ширина пика на полувысоте — от 7 до 52.

Кроме того, был установлен ряд особенностей белковых профилей экстрактов модельных образцов крови относительно соответствующих спектров интактной крови человека. В частности, на масс-спектрах экстрактов крови, содержащей культуры *B. abortus* 544, С-68, 63-75, В-3196, Tulya и С-548, интенсивность фрагментов ($m/z \pm 5$ Da): 5226, 5290, 5422, 5674, 7353, 7565 в 3 — 5 раз превосходила интенсивность аналогичных сигналов интактной крови. Вероятно, это связано с интерференцией сигналов, присутствующих в модельных системах сходных по массе белков, которые содержатся в бактериальных экстрактах бруцелл и в крови человека. В то же время, было отмечено существенное снижение интенсивности в 10 и более раз сигналов ($m/z \pm 5$ Da): 3372, 3440, 3467 на профилях модельных образцов крови, по сравнению с сигналами на масс-спектрах экстрактов интактной крови. Полученные данные могут свидетельствовать о возможном взаимодействии белков крови в модельных образцах с последующим удалением образовавшихся комплексов в процессе пробоподготовки. В то же время, для общих сигналов ($m/z \pm 5$ Da): 6345, 7765, 7938 существенных изменений параметров не наблюдалось.

На масс-спектрах экстракта модельного образца крови, содержащей *B. abortus* 19 ВА, была отмечена группа достоверно воспроизводимых сигналов, отсутствующих на белковых профилях интактной крови ($m/z \pm 5$ Da): 2202, 2224, 2291, 2305, 2319, **2422**, 2531, **2581**, 2635, 2729, 2848, 2876, 2894, 2943, 2995, **3025**, 3189, 3224, **3268**, **3336**, 3428, 3475, **3523**, **3696**, 3823, 3997, **3754**, 4258, **4545**, 4658, 4723, 4756, **4770**, 4897, 4925, **5036**, **5170**, 5534, 5580, 5611, 5749, 6123, 6286, 6314, **6672**, 6922, **7048**, 7591, 7794, 7853, 7881, 7908, 7966, 7995, 8022, 8048, 8341, **9085**, 9302, 10065, 10738, 11358, 12627, 15184, 15899.

Таким образом, нами было подтверждено сохранение выявленного ранее комплекса специфических для *Brucella* spp. сигналов в экстрактах модельных образцов крови. Кроме того, в указанной совокупности помимо 15 родоспецифических сигналов бруцелл (выделены курсивом) присутствовали дополнительные фрагменты, характерные только для модельных образцов крови.

Полученные спектральные характеристики экстрактов модельных образцов крови подтверждают предположение о том, что присутствие возбудителя бруцеллеза в значительной мере меняет белковый профиль крови в исследуемом диапазоне.

Наряду с этим, на масс-спектрах экстрактов модельных образцов крови были выявлены сигналы, отсутствующие на соответствующих профилях интактной крови человека и культур возбудителя бруцеллеза. Например, для модельных образцов крови, содержащих *B. abortus* 19 VA, комплекс указанных сигналов включал ($m/z \pm 5$ Da): 2202, 2319, 2531, 2635, 2848, 2876, 3428, 3823, 3997, 4658, 4723, 4897, 4925, 5580, 5611, 5749, 6123, 6286, 7591, 7794, 7853, 7881, 7908, 7966, 7995, 8022, 8048, 8341, 9302, 10065, 10738, 11358, 12627, 15184, 15899. Для масс-спектров экстрактов модельных образцов крови, содержащих *B. melitensis* 548, выявленная группа специфических сигналов составила ($m/z \pm 5$ Da): 2202, 2291, 2319, 2395, 2635, 2876, 2996, 3197, 3985, 4154, 4258, 4658, 4723, 5021, 5253, 5344, 5462, 5749, 6123, 6862, 7462, 7966, 8048, 8311, 8569, 8649, 8873, 8970, 9290, 10040, 10738, 11072, 11325, 15789, 16114, 16172, 16222, 16336, 16635, 16719.

Полученные результаты позволяют наглядно продемонстрировать изменение качественных характеристик белкового профиля крови человека в присутствии комплекса белков возбудителя бруцеллеза. Мы полагаем, что указанные фрагменты могут быть использованы в качестве диагностических маркеров при MALDI-TOF MS исследовании клинического материала, подозрительного на наличие возбудителя бруцеллеза наряду с ранее изученными родоспецифичными сигналами.

Таким образом, при сопоставлении полученных масс-спектрометрических данных нами охарактеризован комплекс сигналов, позволяющий достоверно дифференцировать интактную кровь условно здорового человека и контаминированную возбудителем бруцеллеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ломинадзе Г.Г., Семенова Е.А., Мотузова О.В., Калакуцкая А.Н., Лазарева А.В. Использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускорения идентификации микроорганизмов в гемокультурах пациентов с подозрением на сепсис. *Лаборатория ЛПУ*. 2014, 4: 17-20.
2. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Русанова Д.В., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016, 2: 11-13.
3. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Бобрышева О.В., Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Сирица Ю.В., Куличенко А.Н. Разработка алгоритма идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015, 4: 96-99.
4. Baranov A.A., Mayanskii A.N., Mayanskii N.A. A new epoch in medical microbiology. *Her. Russ. Acad. Sci.* 2015, 85 (6): 515-522.
5. Ferreira L., Castaño S.V., Sánchez-Juanes F. et al. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. *PLoS One*. 2010, 5 (12): 14235.
6. Grunow R., Jacob D., Klee S. et al. Brucellosis in a refugee who migrated from Syria to Germany and lessons learnt. *Euro Surveill*. 2016, 21 (31): 1-4.
7. Karger A., Melzer F., Timke M. et al. Interlaboratory comparison of intact-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry results for identification and differentiation of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51 (9): 3123-3126.
8. Lasch P., Wahab T., Weil S. et al. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-

- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Results of an interlaboratory ring trial. *J. Clin. Microbiol.* 2015, 53 (8): 2632-2640.
9. Lista F., Reubsaet F., De Santis R. et al. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiology.* 2011, 11: 267.
 10. Nyvang H.G., Kvistholm J.A., Böcher S. et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scand. J. Infect. Dis.* 2010, 42 (9): 716-718.
 11. Šedo O., Sedláček I., Zdráhal Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews.* 2011, 30 (3): 417-434.
 12. Vitr M.A., Mambres D.H., Deghelt M. et al. *Brucella melitensis* invades murine erythrocytes during infection. *Infect. Immunity.* 2014, 82 (9): 3927-3938.
 13. Yonetani S., Ohnishi H., Ohkusu K. et al. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *Intern. J. Infect. Dis.* 2016, 52: 37-42.
 14. Zamanian M., Hashemi Tabar G.R., Rad M. et al. Evaluation of different primers for detection of *Brucella* in human and animal serum samples by using PCR method. *Archives Iranian Medicine.* 2015, 18 (1): 44-50.

Поступила 10.12.16

Контактная информация: Ульшина Диана Васильевна,
355035, Ставрополь, ул. Советская. 13-15, р.т. (865 2)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*А.В.Тришина, Е.А.Березняк, И.Р.Симонова,
Л.М.Веркина, А.Ю.Березняк, М.В.Полева*

БИОРАЗНООБРАЗИЕ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ РОСТОВА-НА-ДОНУ

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Изучение биоразнообразия, чувствительности/устойчивости к антибактериальным препаратам (АБП) штаммов условно патогенных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из поверхностных водоемов Ростова-на-Дону в 2014 — 2016 гг. *Материалы и методы.* Определение родовой и видовой принадлежности энтеробактерий осуществляли по результатам совокупности биохимических тестов, используя программно-аппаратный комплекс MALDI Biotyper. Чувствительность к АБП определяли методом серийных разведений. *Результаты.* За время исследования было выделено 468 штаммов условно патогенных и патогенных энтеробактерий. Идентифицировано 20 родов, 33 вида микроорганизмов. Доминировали представители родов *Escherichia* (37,0%), *Enterobacter* (23,0%), *Klebsiella* (13,2%), *Citrobacter* (8,0%). Чувствительными ко всем АБП в 2014 г. были 8,5% выделенных штаммов, в 2015 г. — 5,2%, в 2016 г. микроорганизмов, чувствительных к АБП, не обнаружено. Количество полирезистентных изолятов нарастало в течение трех лет: в 2014 г. выделено 40,7% штаммов, в 2015 г. — 60,1%, в 2016 г. — 80,0%. Высокой активностью в отношении выделенных энтеробактерий обладали цефтриаксон, гентамицин и ципрофлоксацин. Наибольшую устойчивость фиксировали к ампициллину, налидиксовой кислоте, нитрофурантоину, ко-тримоксазолу. *Заключение.* Полученные результаты позволяют оценить динамику нарастания полирезистентных штаммов энтеробактерий, выделенных из поверхностных водоемов.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 17—23

Ключевые слова: мониторинг, условно патогенные микроорганизмы, антибиотикорезистентность, поверхностные водоемы