

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири
и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

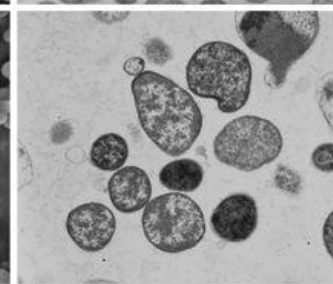
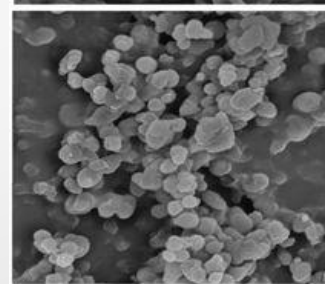
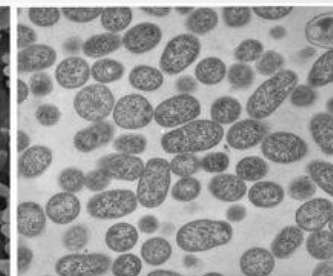
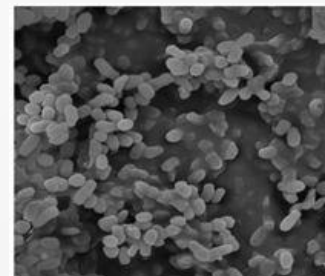
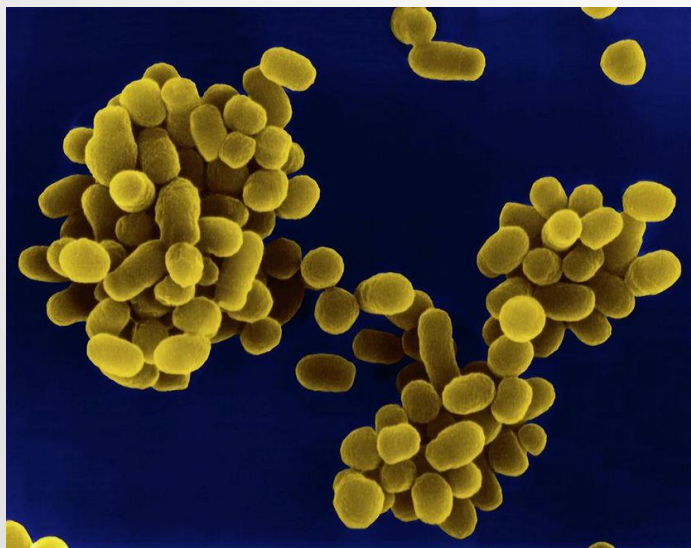
Сравнительный анализ S-, R- и L-форм возбудителя бруцеллёза методом MALDI- ToF масс-спектрометрии

Остяк А.С., Баранникова Н.Л.,
Таликина Т.О. и Балахонов С.В.

ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез – зоонозная инфекция общая для человека и животных – остается социально-экономической проблемой для многих стран мира, в том числе и для России.

Бактериологическое подтверждение этиологии инфекции является абсолютно достоверным критерием при постановке диагноза, а дифференциация возбудителя до вида позволяет эффективно организовать комплекс профилактических мероприятий. Дифференциации подлежат культуры бруцелл, находящиеся только в **S-форме**, однако, под воздействием различных факторов, возбудитель бруцеллеза способен переходить из S- в R- и L-формы, при этом изменяются его основные свойства (биологические, культуральные, морфологические, тинкториальные, агглютинабельность и агглютиногенность). Перечисленное затрудняет проведение идентификации возбудителя сертифицированными диагностическими препаратами и тест-системами. В связи с этим разработка эффективного метода идентификации и дифференциации возбудителя бруцеллеза с использованием MALDI-TOF MS является актуальным.



ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

- *сравнительный анализ белковых профилей бруцелл в S-, R- и L-форме методом MALDI-ToF масс-спектрометрии с целью их корректной идентификации*
- 1) Получение спектров штаммов бруцелл в S-, R- и L-формах;
 - 2) Дополнение базы данных референтных спектров полученными;
 - 3) Контрольная идентификация с расширенной базой данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

- В работе использованы **штаммы** бруцелл в **S-, R- и L-формах**:
 - 1) *Brucella melitensis* 16 М, 63/9, Ether, 281 (в S-, R-форме), 22 (в R-форме), 218 (в S-, R-форме);
 - 2) *B. abortus* 544, В-3196, С-68, 870, Tulya, И-206 (в S- и L-формах);
 - 3) *B. suis* 1330, Thomsen;
 - 4) *B. ovis* 63/290 (в S-, R-форме), 63/91 (в S-, R-форме), 63/281 (в R-форме);
 - 5) *B. neotomae* 65/198;
 - 6) *B. canis* 6/66 (в R-форме);
 - 7) *Brucella* И-6 в L-форме и *Brucella* И-7 в L-форме из коллекции музея живых культур ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора.
- Культуры выращивали на **агаре Альбими** при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в условиях термостата в течении двух суток. Экстракцию проводили с помощью **70% муравьиной кислоты** с последующим добавлением **ацетонитрила** согласно «Инструкции по пробоподготовке и последующему масс-спектрометрическому анализу штаммов ПБА I-IV групп патогенности (за исключением спорообразующих микроорганизмов, дрожжей, грибов)» (Иркутский НИПЧИ). Сбор спектров проводили на масс-спектрометре **MicroFLEX** (Bruker Daltonics). Для получения одиночного масс-спектра использовали 40 импульсов лазера (частота 60 Гц), анализируемый диапазон масса/заряд составлял **2000 – 20000 Да**. С каждой лунки чипа снимался исходный спектр, представляющий собой сумму шести одиночных спектров (240 импульсов лазера).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В отсутствие в базе данных масс-анализатора белковых профилей *Brucella spp.*, идентификация возбудителя давала не достоверные результаты или не проходила совсем

The screenshot displays the MALDI Biotyper interface. On the left, a list of 25 spectra is shown, with the 6th spectrum selected. The central panel shows a mass spectrum for *Bordetella paraperitussis* DSM 13415T DSM, with relative intensity on the y-axis and m/z (10³) on the x-axis. On the right, the Bruker Taxonomy tree shows the classification of the sample. At the bottom, a table lists the detected species and their Log(Score) values.

Detected Species	Log(Score)
<i>Bordetella paraperitussis</i> DSM 13415T DSM	2.102
<i>Bordetella bronchiseptica</i> DSM 13414T DSM	2.048
<i>Bordetella bronchiseptica</i> DSM 10303 DSM	2.020
<i>Bordetella bronchiseptica</i> BORD 781 UZB	1.995
<i>Bordetella bronchiseptica</i> REF 023 UZB	1.983
<i>Bordetella bronchiseptica</i> INE 047 UZB	1.957
<i>Bordetella paraperitussis</i> REF 028 ATCC 15237 UZB	1.869
<i>Bordetella bronchiseptica</i> BORD 760 UZB	1.812
<i>Bordetella bronchiseptica</i> REF 022 UZB	1.804
<i>Bordetella paraperitussis</i> DSM 4922 DSM	1.799

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

- Поэтому на первом этапе работы в базу данных были добавлены (а) белковые профили референтных штаммов: *B. abortus* 544, *B. melitensis* 16 M, *B. suis* 1330. При масс-спектрометрическом исследовании других представителей этих трех видов удалось добиться достоверной идентификации до вида (б), кроме *B. abortus* И-206 в L-форме (в)

а

The screenshot shows the MALDI Biotyper Taxonomy Tree Editor interface. The main window displays a taxonomy tree for the genus *Brucella*. The tree is expanded to show the following structure:

- Brucella (0/4)
 - Brucella abortus (2/2)
 - Brucella abortus bv. 1 (0/0)
 - Brucella abortus S19 (0/0)
 - Brucella melitensis biovar Abortus 2308 (0/0)
 - Brucella canis (0/0)
 - Brucella cetaceae (0/0)
 - Brucella melitensis (1/1)
 - Brucella melitensis 16M (0/0)
 - Brucella melitensis biovar Melitensis (0/0)
 - Brucella microti (0/0)
 - Brucella neotomae (0/0)
 - Brucella ovis (0/0)
 - Brucella pinnipediae (0/0)
 - Brucella suis (1/1)
 - Brucella suis 1330 (0/0)
 - Brucella suis ATCC 23445 (0/0)

At the bottom of the window, there are two tables for Mass Spectral Profiles (MSPs):

Unassigned MSPs (0)			MSPs of 'Brucella abortus' (2)	
MSP Name	Creation Date	Peak List Count	MSP Name	Creation Date
			Brucella abortus I-206L	9/16/2019 4:26:55 PM
			Brucella abortus 544	9/16/2019 3:43:16 PM

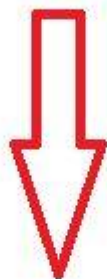
Buttons for OK, Cancel, and Help are visible at the bottom right of the window.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

• б

Spectrum [C:\Users\Jonas\Desktop\Bruce

1	..b.abortus_i206\0_C10\1\1SLin
2	..b.abortus_i206\0_C11\1\1SLin
3	..b.abortus_i206\0_C12\1\1SLin
4	..b.abortus_i206\0_C9\1\1SLin
5	..b.abortus_i206\0_D1\1\1SLin
6	..b.abortus_i206s\0_C4\1\1SLin
7	..b.abortus_i206s\0_C5\1\1SLin
8	..b.abortus_i206s\0_C6\1\1SLin
9	..b.abortus_i206s\0_C7\1\1SLin
10	..b.abortus_i206s\0_C8\1\1SLin



Detected Species	Log(Score)
Brucella abortus 544	2.503
Brucella melitensis 16M	2.357
Brucella suis 1330	2.334
Rhizobium rhizoogenes B167 UFL	1.309
Ralstonia pickettii 21323 1 CHB	1.287
Agrobacterium tumefaciens B336 UFL	1.209
Ochrobactrum tritici DSM 13340T HAM	1.192
Acidovorax avenae ssp avenae DSM 7227T HAM	1.190
Rhizobium rhizoogenes B165 UFL	1.120
Janthinobacterium lividum CIP 106720T HAM	1.080

б

Spectrum [C:\Users\Jonas\Desktop\Bruce

1	..b.abortus_i206\0_C10\1\1SLin
2	..b.abortus_i206\0_C11\1\1SLin
3	..b.abortus_i206\0_C12\1\1SLin
4	..b.abortus_i206\0_C9\1\1SLin
5	..b.abortus_i206\0_D1\1\1SLin
6	..b.abortus_i206s\0_C4\1\1SLin
7	..b.abortus_i206s\0_C5\1\1SLin
8	..b.abortus_i206s\0_C6\1\1SLin
9	..b.abortus_i206s\0_C7\1\1SLin
10	..b.abortus_i206s\0_C8\1\1SLin



Detected Species	Log(Score)
Bordetella parapertussis DSM 13415T DSM	2.102
Bordetella bronchiseptica DSM 13414T DSM	2.048
Bordetella bronchiseptica DSM 10303 DSM	2.020
Bordetella bronchiseptica BORD 781 UZB	1.995
Bordetella bronchiseptica REF 023 UZB	1.983
Bordetella bronchiseptica INE 047 UZB	1.957
Bordetella parapertussis REF 028 ATCC 15237 UZB	1.869
Bordetella bronchiseptica BORD 760 UZB	1.812
Bordetella bronchiseptica REF 022 UZB	1.804
Bordetella parapertussis DSM 4922 DSM	1.799

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

- После внесения в базу данных *B. abortus* И-206 в L-форме стала возможной успешная идентификация L-форм данного вида, в частности *Brucella* И-6 в L-форме и *Brucella* И-7 в L-форме

Spectrum [C:\Users\Jonas\Desktop\Brucella\2016-11-29_bru]

- 1 ...Brucella I-6\0_D1\1\1SLin
- 2 ...Brucella I-6\0_C12\1\1SLin
- 3 ...Brucella I-6\0_D2\1\1SLin
- 4 ...Brucella I-6\0_D3\1\1SLin
- 5 ...Brucella I-6\0_D4\1\1SLin
- 6 ...Brucella I-7\0_D5\1\1SLin
- 7 ...Brucella I-7\0_D6\1\1SLin
- 8 ...Brucella I-7\0_D7\1\1SLin
- 9 ...Brucella I-7\0_D8\1\1SLin
- 10 ...Brucella I-7\0_D9\1\1SLin



Detected Species	Log(Score)
Brucella abortus I-206L	2.341
Bordetella bronchiseptica DSM 13414T DSM	2.034
Bordetella bronchiseptica A220 FLR	2.008
Bordetella pertussis DSM 5571T DSM	1.943
Bordetella bronchiseptica BORD 781 UZB	1.941
Bordetella bronchiseptica DSM 10303 DSM	1.925
Bordetella bronchiseptica REF 023 UZB	1.921
Bordetella bronchiseptica INE 047 UZB	1.853
Bordetella pertussis DSM 4926 DSM	1.713
Bordetella pertussis DSM 4927 DSM	1.707

Selected MSP (1535) Current MSP Spectrum Scores (10)

Spectrum [C:\Users\Jonas\Desktop\Brucella\2016-11-29_bru]

- 1 ...Brucella I-6\0_D1\1\1SLin
- 2 ...Brucella I-6\0_C12\1\1SLin
- 3 ...Brucella I-6\0_D2\1\1SLin
- 4 ...Brucella I-6\0_D3\1\1SLin
- 5 ...Brucella I-6\0_D4\1\1SLin
- 6 ...Brucella I-7\0_D5\1\1SLin
- 7 ...Brucella I-7\0_D6\1\1SLin
- 8 ...Brucella I-7\0_D7\1\1SLin
- 9 ...Brucella I-7\0_D8\1\1SLin
- 10 ...Brucella I-7\0_D9\1\1SLin

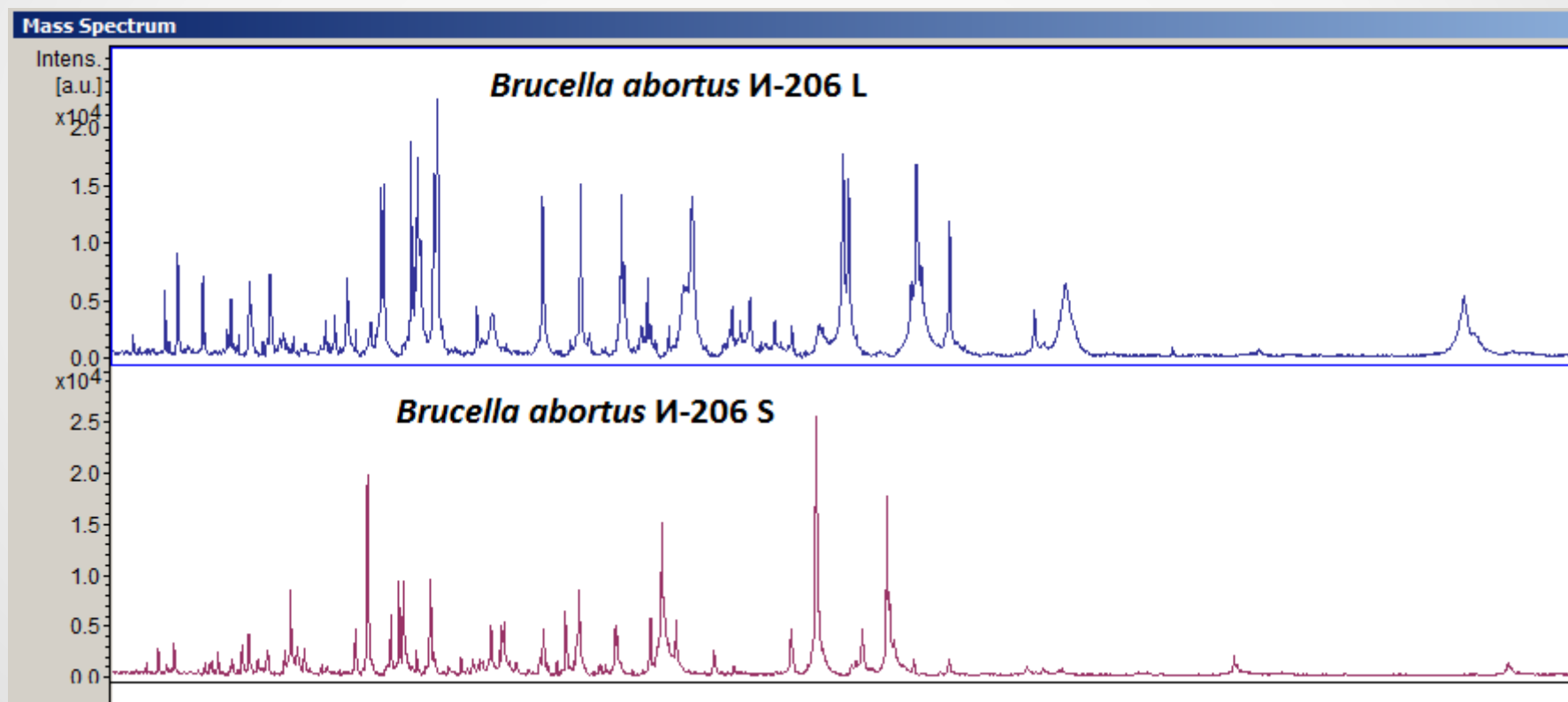


Detected Species	Log(Score)
Brucella abortus I-206L	2.383
Bordetella bronchiseptica REF 023 UZB	2.040
Bordetella bronchiseptica DSM 10303 DSM	2.006
Bordetella bronchiseptica DSM 13414T DSM	1.956
Bordetella paraptussis BORD 724 UZB	1.943
Bordetella bronchiseptica BORD 781 UZB	1.917
Bordetella bronchiseptica INE 047 UZB	1.914
Bordetella paraptussis DSM 13415T DSM	1.879
Bordetella bronchiseptica BORD 760 UZB	1.854
Bordetella bronchiseptica REF 022 UZB	1.851

Selected MSP (1535) Current MSP Spectrum Scores (10)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

- Визуализированные в программе «flexAnalysis 3.3» масс-спектры *B. abortus* И-206 в L- и S-форме



РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Далее база референсных спектров была дополнена спектрами бруцелл в R-форме (*B. canis* 6/66, *B. ovis* 63-290) и была проведена повторная идентификация, которая не обнаружила дифференциации S- и R-форм

- 1 ...B. melitensis 218R\0_A10\1\1SLin
- 2 ...B. melitensis 218R\0_A6\1\1SLin
- 3 ...B. melitensis 218R\0_A7\1\1SLin
- 4 ...B. melitensis 218R\0_A8\1\1SLin
- 5 ...B. melitensis 218R\0_A9\1\1SLin
- 6 ...B. melitensis 218S\0_A1\1\1SLin
- 7 ...B. melitensis 218S\0_A2\1\1SLin
- 8 ...B. melitensis 218S\0_A3\1\1SLin
- 9 ...B. melitensis 218S\0_A4\1\1SLin
- 10 ...B. melitensis 218S\0_A5\1\1SLin
- 11 ...B. ovis 63_290R\0_B4\1\1SLin
- 12 ...B. ovis 63_290R\0_B5\1\1SLin
- 13 ...B. ovis 63_290R\0_B6\1\1SLin
- 14 ...B. ovis 63_290R\0_B7\1\1SLin
- 15 ...B. ovis 63_290R\0_B8\1\1SLin
- 16 ...B. ovis 63_290S\0_A11\1\1SLin
- 17 ...B. ovis 63_290S\0_A12\1\1SLin
- 18 ...B. ovis 63_290S\0_B1\1\1SLin
- 19 ...B. ovis 63_290S\0_B2\1\1SLin
- 20 ...B. ovis 63_290S\0_B3\1\1SLin



Detected Species	Log(Score)
Brucella melitensis C-510	2.541
Brucella melitensis C-570	2.465
Brucella melitensis C-568	2.458
Brucella melitensis C-566	2.439
Brucella melitensis M-97	2.433
Brucella melitensis C-565	2.416
Brucella melitensis C-564	2.390
Brucella melitensis M-117	2.386
Brucella melitensis C-532	2.374
Brucella melitensis 16M	2.345

- 1 ...B. melitensis 218R\0_A10\1\1SLin
- 2 ...B. melitensis 218R\0_A6\1\1SLin
- 3 ...B. melitensis 218R\0_A7\1\1SLin
- 4 ...B. melitensis 218R\0_A8\1\1SLin
- 5 ...B. melitensis 218R\0_A9\1\1SLin
- 6 ...B. melitensis 218S\0_A1\1\1SLin
- 7 ...B. melitensis 218S\0_A2\1\1SLin
- 8 ...B. melitensis 218S\0_A3\1\1SLin
- 9 ...B. melitensis 218S\0_A4\1\1SLin
- 10 ...B. melitensis 218S\0_A5\1\1SLin
- 11 ...B. ovis 63_290R\0_B4\1\1SLin
- 12 ...B. ovis 63_290R\0_B5\1\1SLin
- 13 ...B. ovis 63_290R\0_B6\1\1SLin
- 14 ...B. ovis 63_290R\0_B7\1\1SLin
- 15 ...B. ovis 63_290R\0_B8\1\1SLin
- 16 ...B. ovis 63_290S\0_A11\1\1SLin
- 17 ...B. ovis 63_290S\0_A12\1\1SLin
- 18 ...B. ovis 63_290S\0_B1\1\1SLin
- 19 ...B. ovis 63_290S\0_B2\1\1SLin
- 20 ...B. ovis 63_290S\0_B3\1\1SLin



Detected Species	Log(Score)
Brucella melitensis C-510	2.474
Brucella melitensis C-564	2.416
Brucella melitensis C-568	2.410
Brucella melitensis C-565	2.389
Brucella melitensis C-566	2.385
Brucella melitensis M-97	2.379
Brucella melitensis C-570	2.375
Brucella melitensis M-117	2.326
Brucella melitensis C-532	2.316
Brucella melitensis C-569	2.316

- 31 ...b.mel_22\0_A11\1\1SLin
- 32 ...b.mel_22\0_A12\1\1SLin
- 33 ...b.mel_22\0_B1\1\1SLin
- 34 ...b.mel_22\0_B2\1\1SLin
- 35 ...b.mel_22\0_B3\1\1SLin
- 36 ...b.mel_281\0_A10\1\1SLin
- 37 ...b.mel_281\0_A6\1\1SLin
- 38 ...b.mel_281\0_A7\1\1SLin
- 39 ...b.mel_281\0_A8\1\1SLin
- 40 ...b.mel_281\0_A9\1\1SLin
- 41 ...b.mel_281s\0_A1\1\1SLin
- 42 ...b.mel_281s\0_A2\1\1SLin
- 43 ...b.mel_281s\0_A3\1\1SLin
- 44 ...b.mel_281s\0_A4\1\1SLin
- 45 ...b.mel_281s\0_A5\1\1SLin



Detected Species	Log(Score)
Brucella melitensis C-510	2.293
Brucella melitensis 63.9	2.241
Brucella melitensis M-117	2.176
Brucella melitensis C-567	2.164
Brucella melitensis Ether	2.155
Brucella abortus C-68	2.154
Brucella melitensis 16M	2.143
Brucella suis Thomsen	2.134
Brucella abortus 164-70	2.124
Brucella melitensis C-570	2.121

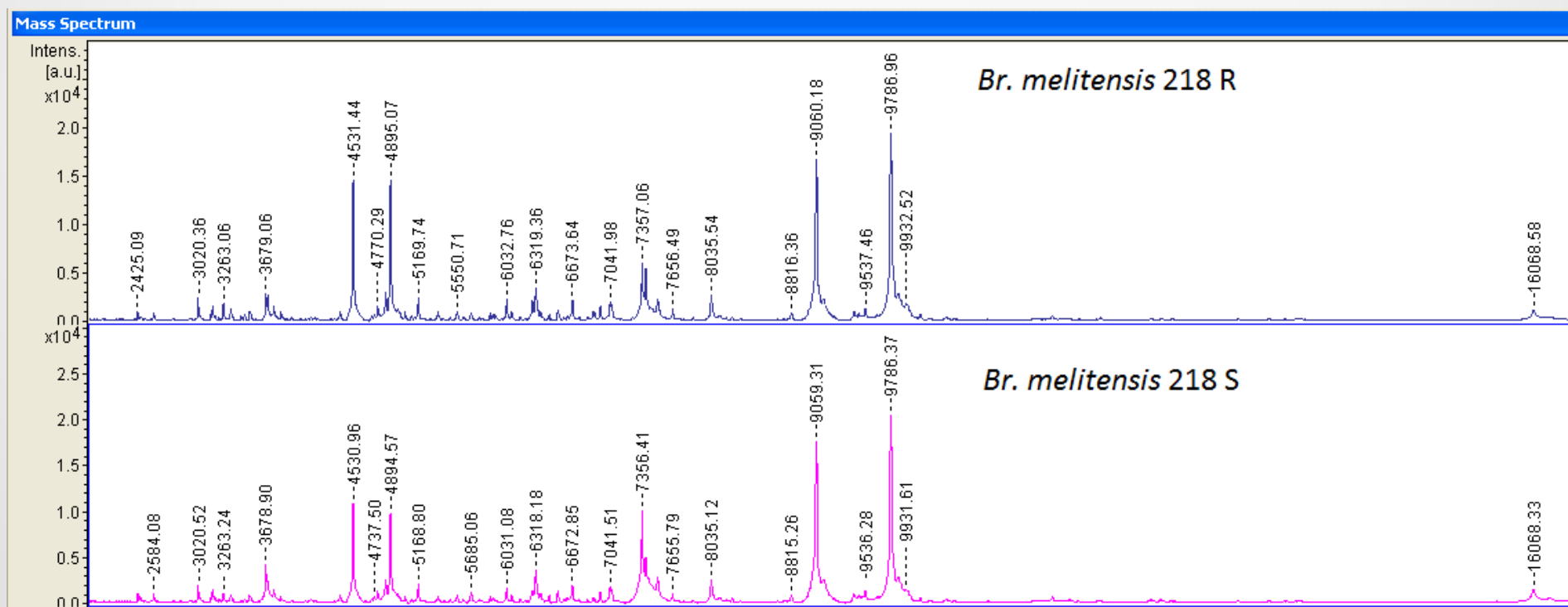
- 31 ...b.mel_22\0_A11\1\1SLin
- 32 ...b.mel_22\0_A12\1\1SLin
- 33 ...b.mel_22\0_B1\1\1SLin
- 34 ...b.mel_22\0_B2\1\1SLin
- 35 ...b.mel_22\0_B3\1\1SLin
- 36 ...b.mel_281\0_A10\1\1SLin
- 37 ...b.mel_281\0_A6\1\1SLin
- 38 ...b.mel_281\0_A7\1\1SLin
- 39 ...b.mel_281\0_A8\1\1SLin
- 40 ...b.mel_281\0_A9\1\1SLin
- 41 ...b.mel_281s\0_A1\1\1SLin
- 42 ...b.mel_281s\0_A2\1\1SLin
- 43 ...b.mel_281s\0_A3\1\1SLin
- 44 ...b.mel_281s\0_A4\1\1SLin
- 45 ...b.mel_281s\0_A5\1\1SLin



Detected Species	Log(Score)
Brucella melitensis M-97	2.071
Brucella melitensis C-510	2.058
Brucella melitensis 63.9	2.035
Brucella melitensis C-567	2.006
Brucella abortus C68	2.003
Brucella melitensis C-532	2.002
Brucella melitensis 16M	2.001
Brucella ovis 63.290 R	1.964
Brucella melitensis C-566	1.954
Brucella melitensis C-568	1.944

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

- Визуализированные в программе «flexAnalysis 3.3» масс-спектры *B. melitensis* 218 в R- и S-форме



ВЫВОДЫ

- Полученные результаты дают основание предположить, что L- и S-формы одного и того же вида значительно различаются по белковым профилям.
- R- и S-формы бруцеллёзного микроба, напротив, очень схожи по белковому профилю, что позволяет идентифицировать до вида возбудителя в R-форме.
- Метод масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией может быть использован для ускоренной идентификации бруцелл.
- Для эффективного применения метода необходимо создание представительной электронной базы данных масс-спектров коллекционных штаммов бруцелл как в S-, так и в L-формах.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

