

УДК 602.3:579.6

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ МЕТОДОМ MALDI-TOF MS\*

**Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент,**

**Тел.8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru**

**Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,**

**Тел.8(8422) 55-95-47, dav\_ul@mail.ru**

**А.В. Мاستиленко, кандидат биологических наук, доцент,**

**Тел.8(8422) 55-95-47, mav0608@yandex.ru**

**Е.В. Сульдина, ассистент, Тел.8(8422) 55-95-47,**

**ekaterina-suldina@rambler.ru**

**С.В. Аннюк, аспирант, Тел.8(8422) 55-95-47, sv.annyuk@gmail.com**

**ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ**

**Ключевые слова:** *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter cloacae*, MALDI-TOF-профилирование, масс-спектрометрия.

В статье представлены результаты использования масс-спектрометрии MALDI-TOF с целью идентификации микроорганизмов видов *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter cloacae*, которые были выделены в 2016 году из патологического материала и объектов санитарного надзора животноводческих и птицеводческих помещений хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям.

**\*Исследования проводятся при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект «Геномика и биология кандидатных бактериофагов для терапии энтеробактериальных инфекций в ветеринарной медицине» №16-44-732038.**

**Введение.** Характеристика и дифференциация микробного протеома развивались и прогрессировали с использованием методов разделения белка в геле. Разделение нативных клеточных белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в сочетании с компьютерным анализом использовали в нескольких исследованиях для идентификации и классификации микроорганизмов [1-3]. При выполнении в стандартизованных условиях эта методика была достаточно воспроизводимой. Однако профилирование белков в ПААГ не стало популярным среди микробиологов. Это может быть связано с отсутствием обширных баз данных для идентификации неизвестных микроорганизмов; требованием высоко стандартизованных условий, включающих рост неизвестных

микроорганизмов на идентичных средах, стандартизированные электрофоретические условия, процедуры окрашивания и последующий анализ образцов; техника не являлась достаточно точной, для различия сильно похожих штаммов.

Двумерный гель-электрофорез (2-DE) также не стал популярным среди микробиологов, так как он был трудоемким практическим методом, даже после того, как появились готовые решения для его проведения и улучшенное программное обеспечение для анализа геля [4]. Достоинства и недостатки других протеомных подходов были также рассмотрены [5].

Цель работы – установление видовой принадлежности штаммов бактерий Prot 2, Ye3, En2, выделенных коллективом авторов в 2016 году, методом MALDI-TOF спектрометрии.

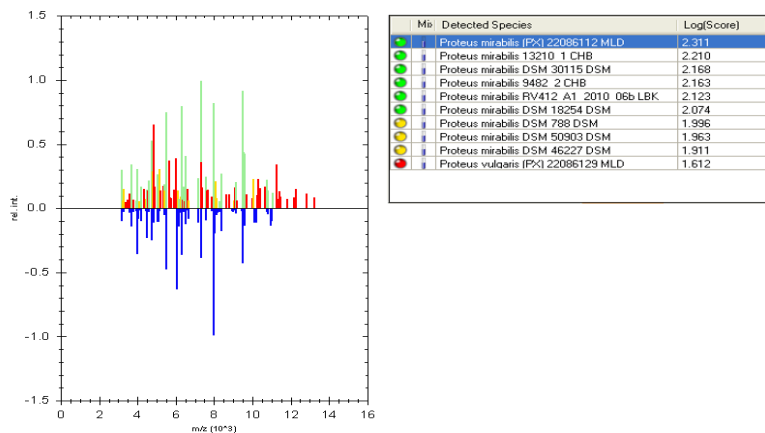
**Объекты и методы исследований.** Штаммы бактерий Prot 2, Ye3, En2, которые были выделены коллективом авторов из патологического материала и объектов санитарного надзора животноводческих и птицеводческих помещений из хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям и идентифицированы на основании изучения тинкториальных, культурально-морфологических и биохимических свойств, следующим образом: Prot2 определена как *Proteus mirabilis*, Ye3 – как *Yersinia enterocolitica*, En2 – *Enterobacter cloacae* [6-7].

В исследованиях использовали следующие материалы: синапиновая кислота (Sigma-Aldrich, USA), ацетонитрил (Sigma-Aldrich, USA), трифторуксусная кислота (Sigma-Aldrich, USA), мясо-пептонный бульон (ГМФ-агар), (НИЦФ.Санкт-Петербург, РФ), мясо-пептонный агар (ГМФ-агар) (НИЦФ.Санкт-Петербург, Россия), спирт этиловый 70°.

Для культивирования бактерий использовались стандартные условия. Бактерии выращивались на мясопептонном бульоне (МПБ) в условиях термостата при 37°C в течение 12 часов, затем культура рассевалась методом штриха на мясопептонный агар (МПА) для получения отдельных колоний.

Клетки каждого штамма непосредственно наносили на стальной планшет MALDI (две одиночные колонии в дубликатах) с использованием одноразовой петли и с добавлением 1 мкл матрицы, состоящей из насыщенного раствора синапиновой кислоты в 60 % ацетонитрила - 0,3% трифторуксусной кислоты и высушивали на воздухе в течение нескольких минут при комнатной температуре.

Отпечатки белков с различными молекулярными массами получали при помощи MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex LT (BrukerCorp.,



**Рисунок 1 - Показатели белковых спектров бактериального изолята *Proteus mirabilis* Prot2 и его идентификация по результатам использования программного обеспечения MALDI Biotyper**

Billerica, USA) с обнаружением в линейном положительном режиме на частоте лазера 50 Гц и в диапазоне масс от 2000 до 30 000 Да. Напряжение разгона составляло 20 кВ, а время задержки экстракции составляло 200 нс. Для генерации каждого ионного спектра использовалось не менее 10 лазерных снимков на образец. Для каждого бактериального образца в общей сложности 100 отпечатков белков с различными молекулярными массами усредняли и обрабатывали с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper (BrukerCorp., Billerica, USA).

**Результаты исследований.** В ходе выполнения масс-спектрометрии MALDI-TOF были получены следующие результаты, представленные на рисунках 1-3.

**Заключение.** Для установления видовой принадлежности, выделенных нами в 2016 году из патологического материала и объектов санитарного надзора бактериальных культур было проведено их MALDI-TOF-профилирование. Так, с помощью анализа протеомов штамм Prot2 определен как *Proteus mirabilis*, Ye3 – как *Yersinia enterocolitica*, En2 – *Enterobacter cloacae*. Идентификация вышеназванных штаммов первоначально проводилась по общеизвестным схемам бактериологической дифференциации представителей семейства *Enterobacteriaceae*, осно-

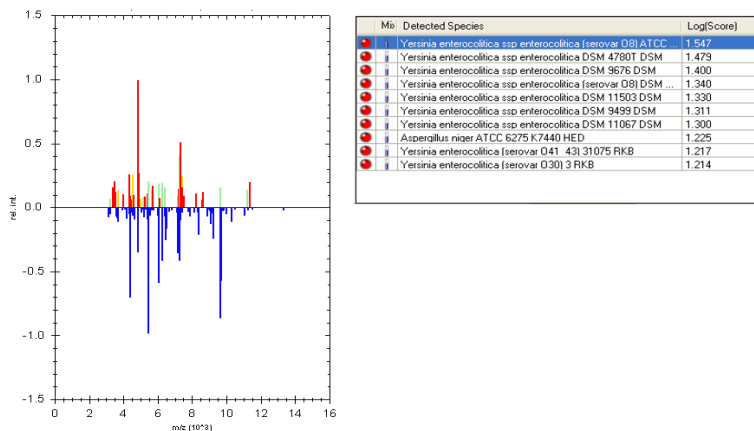


Рисунок 2 - Показатели белковых спектров бактериального изолята *Yersinia enterocolitica* Ye3 и его идентификация по результатам использования программного обеспечения MALDI Biotyper

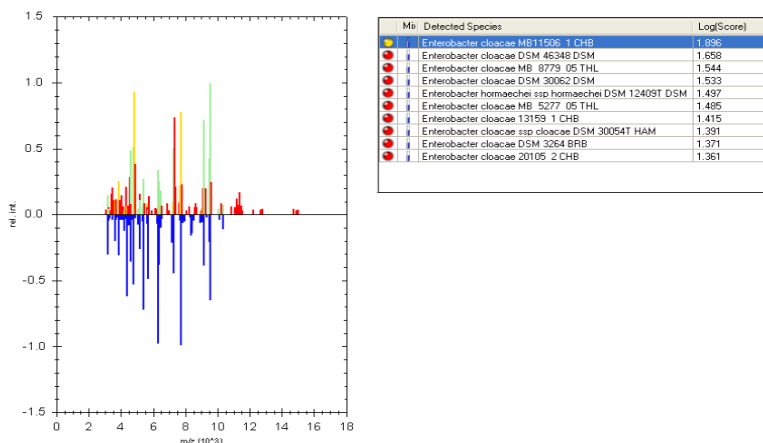


Рисунок 3 - Значения белковых спектров изолята *Enterobacter cloacae* En2 и его идентификация по результатам использования программного обеспечения MALDI Biotyper

ванной на изучении тинкториальных, культурально-морфологических и биохимических свойств. Для определения ферментативной активности использовался классический метод инокуляции культуры в пробирки, содержащие субстраты и индикаторы [6-7]. Полученный результат позволил определить вид микроорганизма в течение 6-7 суток.

В последние годы в нескольких отчетах была продемонстрирована возможность использования масс-спектрометрии (MSF) (MALDI-TOF) для идентификации микроорганизмов [8]. Обнаружение образцов массы белка стало удобным инструментом для быстрого анализа бактерий [9]. Метод анализирует профили белков, которые извлекаются из целых бактерий. Масс-спектрометр MALDI может эффективно обнаруживать многочисленные молекулы одновременно. Массовые образцы белка могут использоваться для родовой, видовой и в некоторых случаях внутривидовой идентификации микроорганизмов. Данный метод обнаружения подтвержден в нескольких исследованиях для различных грамотрицательных патогенов, передающихся через пищевые продукты [10].

#### *Библиографический список*

1. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium* / V. C. Wasinger, S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak et al. // *Electrophoresis*. – 1995. - Vol. 16. - P. 1090-1094.
2. Jungblut, P. R. Proteomics of microbial pathogens / P. R. Jungblut, M. Hecker // *Proteomics*. - 2004. - Vol. 4. - № 10. - P.2829–2830.
3. Polyphasic analysis of strains of the genus *Capnocytophaga* and Centers for Disease Control group DF-3 / P. Vandamme, M. Vancanneyt, A. van Belkum et al. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* - 1996. - Vol. 46. - № 3. - P. 782-791.
4. Cash, P. Proteomics in the study of the molecular taxonomy and epidemiology of bacterial pathogens / P. Cash // *Electrophoresis*. - 2009. - Vol. 1. - P. 133-141.
5. Tiwari, V. Quantitative proteomics to study carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* / V. Tiwari, M. Tiwari // *Front. Microbiol.* - 2014. - Vol. 5. - № 512. – P.1-7.
6. Васильев, Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактерий рода *Proteus* / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. – 2017. - № 2 (38). – С. 70-76.
7. Сульдина, Е.В. Выделение бактерий и бактериофагов *Yersinia enterocolitica* / Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. – 2017. - № 3 (39). – С. 50-55.

8. Sauer, S. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria / S. Sauer, M. Kliem // Nat. Rev. Microbiol. - 2010. - Vol. 8. - P. 74-82.
9. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / R. Dieckmann, R. Helmuth, M. Erhard et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. - Vol. 74. - P. 7767-7778.
10. Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / T.H. Hazen, R.J. Martinez, Y. Chen et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75. – P. 6745-6756.

## IDENTIFICATION OF STRAINS OF *ENTEROBACTERIA* USING MALDI-TOF MS

*Feoktistova N.A., Vasilyev D. A., Mastilenko A.V.,  
Suldina E. V., Annyuk S. V.*

**Keywords:** *Proteus mirabilis, Yersinia enterocolitica, Enterobacter cloacae, MALDI-TOF profiling, mass spectrometry.*

*The article presents the results of the use of mass spectrometry MALDI-TOF to identify microorganisms of the species *Proteus mirabilis, Yersinia enterocolitica, Enterobacter cloacae*, which were isolated in 2016 from pathological material and objects of sanitary supervision of livestock and poultry farms, disadvantaged in gastrointestinal diseases.*