

УСТАНОВЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ МЕТОДОМ MALDI-TOF MS

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Мастиленко Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Сутьдина Екатерина Владимировна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47; e-mail: feokna@yandex.ru

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. Первично видовая дифференциация проводилась на основании изучения тинкториальных, культурально-морфологических и биохимических свойств. Для исследования протеомов бактериальных культур было проведено их MALDI-TOF-профилирование (анализ профилей белков, которые извлекаются из целых бактерий) и подтверждено их соответствие определяемым видам. Отпечатки белков с различными молекулярными массами получали с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex LT (BrukerCorp., 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 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). Так, в проведенных исследованиях установлено, что штамм Prot2 принадлежит к виду *Proteus mirabilis*, Ye3 – *Yersinia enterocolitica*, En2 – *Enterobacter cloacae*.

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

Геномная информация в микробной клетке биоинформирует нас о наличии более чем 2000 белков [1]. Считается, что для геномов, которые содержат менее 1000 генов, более 50 % прогнозируемого протеома может быть идентифицировано из генома. Аналогично, 30 % и 10 % прогнозируемого протеома могут быть идентифицированы из геномов, которые несут около 2500 и около 4000 генов соответственно [2]. Таким образом, микробный геном, содержащий 600-7000 предсказанных генов, представляет собой среднюю или сложную систему, где применение протеомики может обеспечить знание значительной части протеома микроорганизма.

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 классифи-

кации микроорганизмов [3]. При выполнении в стандартизированных 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 стандартизированных 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 Prot2, Ye3, En2, выделенных коллективом авторов в 2016 году, методом MALDI-TOF спектрометрии.

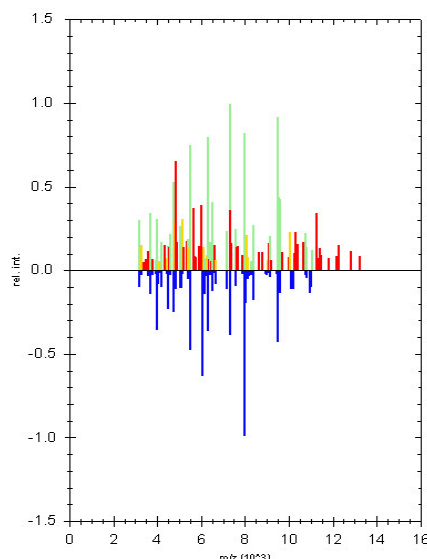
Объекты и методы исследований

Штаммы бактерий Prot2, 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°.

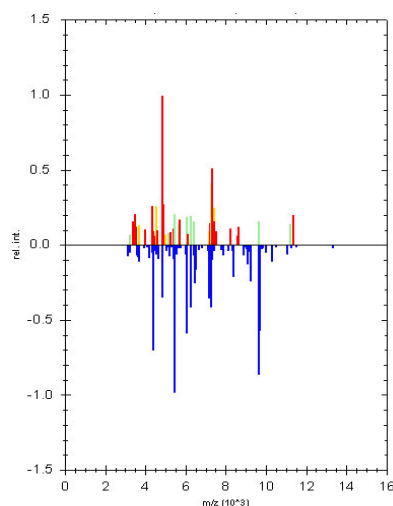
Для культивирования бактерий использовались стандартные условия. Бактерии выращивались на мясопептонном бульоне (МПБ) в условиях термостата при 37 °C в течение 12 часов, затем культура рассевалась методом штриха на мясопептонный агар (МПА) для получения отдельных колоний.

Клетки каждого штамма непосредственно наносили на стальной планшет MALDI (две одиночные колонии в дубликатах) с использованием одно-



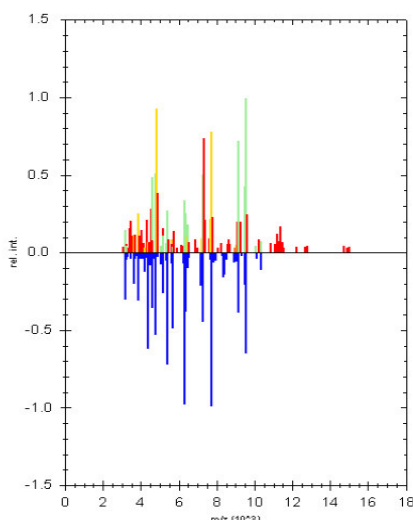
Mis	Detected Species	Log(Score)
1	<i>Proteus mirabilis</i> (PX) 22086112 MLD	2.311
2	<i>Proteus mirabilis</i> 13210 1 CHB	2.210
3	<i>Proteus mirabilis</i> DSM 30115 DSM	2.168
4	<i>Proteus mirabilis</i> 9482 2 CHB	2.163
5	<i>Proteus mirabilis</i> RV412 A1 2010 06b L8K	2.123
6	<i>Proteus mirabilis</i> DSM 18254 DSM	2.074
7	<i>Proteus mirabilis</i> DSM 788 DSM	1.996
8	<i>Proteus mirabilis</i> DSM 50903 DSM	1.963
9	<i>Proteus mirabilis</i> DSM 46227 DSM	1.911
10	<i>Proteus vulgaris</i> (PX) 22086129 MLD	1.612

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



Mis	Detected Species	Log(Score)
1	<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i> (serovar O8) ATCC	1.547
2	<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i> DSM 47801 DSM	1.479
3	<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i> DSM 9676 DSM	1.400
4	<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i> (serovar O8) DSM ...	1.340
5	<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i> DSM 11503 DSM	1.330
6	<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i> DSM 9499 DSM	1.311
7	<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i> DSM 11067 DSM	1.300
8	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275 K7440 HED	1.225
9	<i>Yersinia enterocolitica</i> (serovar O4) 431 31075 RKB	1.217
10	<i>Yersinia enterocolitica</i> (serovar O30) 3 RKB	1.214

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



Mis	Detected Species	Log(Score)
1	<i>Enterobacter cloacae</i> MB11506 1 CHB	1.896
2	<i>Enterobacter cloacae</i> DSM 46348 DSM	1.658
3	<i>Enterobacter cloacae</i> MB 8779 05 THL	1.544
4	<i>Enterobacter cloacae</i> DSM 30062 DSM	1.533
5	<i>Enterobacter hormaechei</i> ssp. <i>hormaechei</i> DSM 12409T DSM	1.497
6	<i>Enterobacter cloacae</i> MB 5277 05 THL	1.485
7	<i>Enterobacter cloacae</i> 13159 1 CHB	1.415
8	<i>Enterobacter cloacae</i> ssp. <i>cloacae</i> DSM 30054T HAM	1.391
9	<i>Enterobacter cloacae</i> DSM 3264 BRB	1.371
10	<i>Enterobacter cloacae</i> 20105 2 CHB	1.361

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

разовой 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., Billerica, USA) с обнаружением в линейном положении 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.

Выводы

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 выше-названных штаммов первоначально проводилась по общеизвестным схемам бактериологической дифференциации представителей семейства *Enterobacteriaceae*, основанной 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 родо-

вой, видовой и в некоторых случаях внутривидовой идентификации микроорганизмов. Данный метод обнаружения подтвержден в нескольких исследованиях для различных грамотрицательных патогенов, передающихся через пищевые продукты [10-14].

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.
11. Species specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral MALDI-TOF MS analysis / M. Alispahic, K. Hummel, D. Jandreski-Cvetkovic [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 59. - P. 295-301.
12. Rapid genus and species specific identification

of *Cronobacter* spp. by MALDI-TOF Mass spectrometry / R. Stephan, D. Ziegler, V. Pflüger [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48. – P. 2846-2851.

13. Liquid chromatography/mass spectrometry characterization of *Escherichia coli* and *Shigella* species /

R.A. Everley, T.M. Mott, S.A. Wyatt [et al.] // J. Am. Soc. MassSpectrom. – 2008. – Vol. 19. – P. 1621-1628.

14. Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification / S. Ekström, P. Onnerfjord, J. Nilsson [et al.] // Anal. Chem. – 2000. – Vol. 72, No. 2. – P. 286-293.

SPECIES IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIA STRAINS BY MEANS OF MALDI-TOF MS

Vasiliev D.A., Feoktistova N.A., Mastilenko A.V., Suldina E.V.

FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017. Ulyanovsk, Novyy Venets Boulevard, 1; 8 (8422) 55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

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

The article presents results of MALDI-TOF mass spectrometry usage for identification of microorganisms of *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter cloacae* species, which were isolated in 2016 from pathological material and sanitary control facilities of livestock and poultry farms, unfavourable as far as gastrointestinal diseases were concerned. Primarily, species differentiation was carried out on the basis of studying tinctorial, cultural-morphological and biochemical properties. To study the proteomes of bacterial cultures, their MALDI-TOF profiling (analysis of protein profiles that are extracted from whole bacteria) was carried out and their compliance was confirmed. Prints of proteins with different molecular weights were obtained using a MALDI-TOF Microflex LT mass spectrometer (BrukerCorp., Billerica, USA) with detection in a linear positive mode at a laser frequency of 50 Hz and in the mass range from 2000 to 30,000 Da. The creep voltage was 20 kV, and the extraction dwell time was 200 ns. To generate each ion spectrum, at least 10 laser images per sample were used. For each bacterial sample, a total of 100 prints of proteins with different molecular weights were averaged and processed using the MALDI Biotyper software (BrukerCorp., Billerica, USA). Thus, in the studies it was established that the Prot2 strain belongs to *Proteus mirabilis* species, Ye3-*Yersinia enterocolitica*, En2-*Enterobacter cloacae*.

Bibliography

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, No. 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, No. 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, No. 512. - R.1-7.
6. Vasiliev, D.A. Isolation and study of biological properties of bacteria of *Proteus* genus / D.A. Vasiliev, N.A. Feoktistova, S.N. Zolotukhin // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2017. - No. 2 (38). - P. 70-76.
7. Suldina, E.V. Isolation of *Yersinia enterocolitica* bacteria and bacteriophages / E.V. Suldina, D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2017. - No. 3 (39). - P. 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.]. 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.
11. Species specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral MALDI-TOF MS analysis / M. Alispahic, K. Hummel, D. Jandreski-Cvetkovic [et al.] // J. Med. Microbiol. - 2010. - Vol. 59. - P. 295-301.
12. Rapid genus and species specific identification of *Cronobacter* spp. by MALDI-TOF Mass spectrometry / R. Stephan, D. Ziegler, V. Pflüger [et al.] // J. Clin. Microbiol. - 2010. - Vol. 48.-P. 2846-2851.
13. Liquid chromatography / mass spectrometry characterization of *Escherichia coli* and *Shigella* species / R.A. Everley, T.M. Mott, S.A. Wyatt [et al.] // J. Am. Soc. MassSpectrom. - 2008. - Vol. 19. P. 1621-1628.
14. Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification / S. Ekström, P. Onnerfjord, J. Nilsson [et al.] // Anal. Chem. - 2000. - Vol. 72, No. 2. - P. 286-293.