

УДК 579.62

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГАФНИОЗА МЕТОДОМ MALDI

**Золотухин Сергей Николаевич**, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»

**Васильев Дмитрий Аркадьевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»

**Золотухин Дмитрий Сергеевич**, кандидат биологических наук

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

432017, г. Ульяновск, Бульвар Новый Венец, 1, тел.: 8(8422)55-95-47;

e-mail fvm.zol@yandex.ru

**Ключевые слова:** *Hafnia alvei*, *E.coli*, *Salmonella sp.*, MALDI (Матрично-активированная лазерная десорбция, ионизация), энтеробактерии, идентификация.

В статье отражены результаты идентификации энтеробактерий новым методом матрично-активированной лазерной десорбцией (MALDI). Отмечено, что ферментативные свойства некоторых штаммов эшерихий и сальмонелл могут быть схожи со свойствами гафний, и поэтому их часто бывает трудно отличить по многим ферментативным тестам. Показано преимущество использованного метода MALDI в сравнении с классическим бактериологическим методом исследования и методом фагоидентификации.

### Введение

В последние годы значительно возросло количество заболеваний животных и человека, вызванных условно-патогенными микроорганизмами или протекающих с их участием [1]. Одним из таких микроорганизмов является представитель семейства *Enterobacteriaceae*, относящийся к роду *Hafnia* с единственным видом *Hafnia alvei*.

Несмотря на то, что *Hafnia alvei* известны как маловирулентные представители нормальной микрофлоры слизистых оболочек и кожи человека и животных, имеются научные данные о том, что они способны вызывать ряд заболеваний у человека, таких как менингит, гастроэнтероколиты,

пневмонии, инфекции мочевыводящих путей и другие воспалительные процессы, а также диарею [2,3].

Имеются сообщения о гафниях, как возбудителях желудочно-кишечных заболеваний у новорожденных телят и поросят-сосунков [1, 4, 5].

Гафниоз пчел зарегистрирован самостоятельной нозологической единицей как заболевание этих насекомых (другое название – паратиф пчёл) [6].

При диагностике гафниоза основной проблемой является то, что на сегодняшний день нет доступного и дешевого метода индикации и идентификации *H.alvei*, а при использовании классических микро-

биологических методов (микроскопия, изучение ферментативных свойств), этот микроорганизм трудно дифференцировать от других энтеробактерий, в частности *E.coli* и *Salmonella spp.*

Один из наиболее точных методов идентификации микроорганизмов является MALDI.

MALDI (Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) – способ ионизации вещества, использующийся при масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрия — это физический метод измерения отношения массы заряженных частиц вещества к их заряду.

В основе метода лежит использование вспомогательного вещества - «матрицы», свойства которого обуславливают понижение деструктивных свойств лазерного излучения и ионизацию анализируемого вещества. Приборы, которые реализуют этот метод, называются масс-спектрометрами.

Принцип MALDI-TOF в масс-спектрометрии обладает высокой чувствительностью и строгой специфичностью. Он позволяет проводить масс-спектрометрический анализ белковой фракции исследуемой клетки и получать уникальные для данного вида масс-спектры с высокой точностью и разрешением, обеспечивая высокую воспроизводимость и точность масс, характеризующие исследуемый объект по типу «отпечатков пальцев» (Gaskell, 2000).

Целью наших исследований явилось идентификация бактерий вида *Hafnia alvei* методом MALDI в сравнении с бактериологическим методом и методом фагоидентификации.

#### **Объекты и методы исследований**

Для изучения широты распространения *Hafnia alvei* в животноводческих, птицеводческих и пчеловодческих хозяйствах мы провели бактериологические исследования объектов внешней среды, патологического материала, взятого из хозяйств Ульяновской, Саратовской, Самарской, Пензенской областей, республик Татарстан, Мордовии и Чувашии. Объектами исследования были трупы пчел, патологический материал трупов

кур, фекалии больных диареей поросят и птицы, сточные воды птицефабрик и молочнотоварных ферм.

Выделение культур *Hafnia alvei* проводили по общепринятым методикам [8] и в соответствии с правилами, изложенными в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденными ГУВ СССР 1999 году.

Выделенные культуры грамотрицательных палочек подвергали фагоидентификации методом «стекающей капли» на плотной питательной среде с использованием выделенного и селекционированного нами специфического бактериофага Н-1 УГ-СХА [9-16].

Идентификацию гафний масс-спектрометрическим методом проводили на бактериологическом анализаторе времяпролетном MALDI масс-спектрометре (Microflex, Bruker Daltonics, Германия), который позволяет записывать масс-спектр одного образца в среднем за 20-30 секунд. Данный масс-спектрометр оснащен азотным лазером с частотой импульсов до 20 Гц.:

#### **Результаты исследований**

Для выделения культур *Hafnia alvei* из трупов пчел исследуемый материал высевали на дифференциально-диагностические среды (ДДС) Эндо и Плоскирева и инкубировали при температуре 37°C в течение 18 – 24 часов. На среде Эндо отбирали нежные полупрозрачные бесцветные колонии в диаметре 2-4 мм, или бледно-розовые, мелкие (1-1,5 мм в диаметре). На агаре Плоскирева бледно-желтые или бесцветные колонии. Далее отдельно взятые колонии пересеивали на скошенный агар и инкубировали при 37°C 18 часов.

Культуры, полученные после посева колоний с ДДС, окрашивали по Граму и микроскопировали. В случае обнаружения в мазках мелких, грамотрицательных с закругленными концами полимерных палочек, длиной 1-2 и шириной 0,3-0,5 мкм, идентифицировали культуру по ферментативным свойствам и в пробе со специфическим бактериофагом.

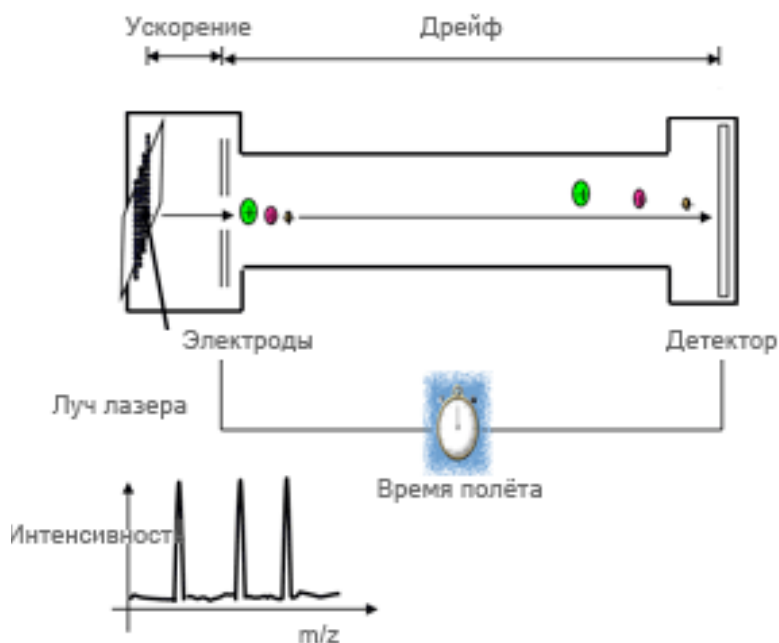


Рис. 1 - Принцип работы MALDI TOF масс-спектрометра

Идентификацию гафний масс-спектрометрическим методом проводили в 2 этапа. На первом этапе образцы подготавливали к анализу, для этого на подложке масс-спектрометра смешивали бактериальную массу из колонии *Hafnia alvei* с 2',5' дигидроксibenзойной кислотой.

На втором этапе помещали подготовленный образец в MALDI масс-спектрометр (Microflex, Bruker Daltonics, Германия) и подвергали воздействию наносекундных лазерных импульсов. При этом молекулы матрицы и аналита переходили в газовую фазу, а протонированные молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Под действием электрического поля ионизированные белки двигались от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам (рис. 1).

Все измерения проводили в линейной моде, в режиме положительных ионов с напряжением на электроде ускорителя – 20.0 кВ, накапливающем электроде – 18.6 кВ, фокусирующей линзе – 9.2 кВ и временем задержки анализатора – 400 нсек. Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона  $m/z$  от 2000 до 20000.

С целью дальнейшего статистического

анализа полученных данных и для определения видовой идентификации исследуемых бактериальных культур запись масс-спектров производилась в автоматическом режиме (AutoExecute, Bruker Daltonics). Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы Bruker Daltonics (Германия): FlexControl 3.0 и Biotyper 2.0.

Масс-спектр анализ сравнивали со спектрами из базы данных, и на основании сведений о массах характеристических белков идентифицировали изучаемые микроорганизмы. На сегодняшний день в базе МАЛДИ информация по 750 видам различным бактериям.

В результате проведенных исследований нами по ферментативным тестам было идентифицировано как *Hafnia alvei* 25 штаммов выделенных энтеробактерий, из них 7 штаммов были нечувствительны к специфическому бактериофагу Н-1 УГСХА.

4 штамма бактерий, нечувствительных к гафниозному бактериофагу по результатам исследования методом MALDI TOF масс-спектрометра, были идентифицированы как *Salmonella spp.* и *Escherichia spp.*, видовая принадлежность 21 культуры была подтверждена как *Hafnia alvei* (табл. 1).

#### Выводы

Таким образом, MALDI метод идентификации микроорганизмов удобен, более специфичен, чем классический бактериологический метод, имеет более широкий диапазон идентификации, чем проба со специфическим бактериофагом, и его можно с успехом применять для идентификации *Hafnia alvei*.

#### Библиографический список

1. Золотухин, С.Н. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями / С.Н. Золотухин, Л.С. Каврук, Д.А. Васильев. – Ульяновск. – 2005. - С. 5-8.
2. Mojtabae, A. Enterobacter hafnia

meningitis / A. Mojtabaee, A. Siadati, J. Pediatr. - 1978. - V.93. - P. 1062-1063.

3. Reina, J. Acute gastroenteritis caused by *Hafnia alvei* in children / J. Reina, J. Hervas, N. Borrell // Clin. Infect. Dis. - 1993. - V. 16. - P. 443

4. Золотухин, С.Н. Неспецифическая профилактика смешанной кишечной инфекции телят и поросят / С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Л.С. Каврук // [Практик](#). – СПб. – 2006. – № 6. – С. 72.

5. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин – Ульяновск, 2004. – С. 64 – 75.

6. Новиков, В. Б. Пчёлы, цветы и здоровье / В.Б. Новиков // Пчеловодство. – 2005. - №1. – С. 12-15.

7. Gaskell, SJ. Electrospray: principles and practice / J. Mass Spectrom. 2000, 35, 677-688.

8. Васильев, Д.А. Методы общей бактериологии : учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никишина.– Ульяновск, 1998. – 150 с.

9. Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий вида *Morganella morganii* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 4 октября 2004 года) / С.Н. Золотухин, А.Ю. Кузнецов, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук. – РАСХН. – Москва, 2005. – 16 с.

10. Методические рекомендации по индикации и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157:H7 и O157:H- в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 4 октября 2004 года) / С.Н. Золотухин, Н.И. Молофеева, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук. – РАСХН. – Москва. – 2005. – 16 с.

11. Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий рода *Citrobacter* в патологическом мате-

риале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 4 октября 2004 года) / С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук – РАСХН. – Москва, 2005. – 16 с.

12. Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий рода *Klebsiella* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 26 июня 2006 года) / С.Н. Золотухин, Е.А. Бульканова, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук. – РАСХН. – Москва, 2006. – 16 с.

13. Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий рода *Proteus* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 26 июня 2006 года) / С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук. – РАСХН. – Москва, 2006. – 16 с.

14. Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий рода *Enterobacter* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 26 июня 2006 года) / С.Н. Золотухин, Е.Н. Пожарникова, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук. – РАСХН. – Москва, 2006. – 16 с.

15. Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий вида *Yersinia enterocolitica* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфического бактериофага (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 26 июня 2006 года) / С.Н. Золотухин, Б.М. Коритняк, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук. – РАСХН. – Москва, 2006. – 16 с.