

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

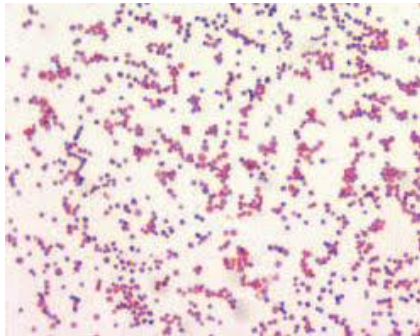
Определение места MALDI- TOF масс-спектрометрии в системе лабораторной диагностики туляремии

Куликалова Е.С., Мазепа А.В., [Сынгеева А.К.](#)

Иркутск, 2019

Туляремия -

- Генерализованное инфекционное заболевание, протекающее с лихорадкой, интоксикацией и поражением лимфатических узлов. Относится к группе природно-очаговых инфекций. Этиологический агент – *Francisella tularensis* - относится к ПБА II группы патогенности.



- Ареал возбудителя туляремии охватывает страны Северного полушария. На территории России впервые официально зарегистрирована в 1926 г.



Классификация

- Возбудитель туляремии относится к γ -подклассу протеобактерий, семейству *Francisellaceae*, роду *Francisella*.
- В настоящее время род *Francisella* представлен семью видами: *F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. persica*, *F. noatunensis*, *F. marina*, *F. halioticida*, *F. hispaniensis*.
- Внутри патогенного вида *F. tularensis* различают 4 подвида: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*. Голарктический подвид имеет три биовара: *japonica*, *EryS* (эритромицинчувствительный) и *EryR* (эритромицин-резистентный). *F. tularensis* подвид *tularensis* включает две субпопуляции: AI и AII.
- Для большинства природных очагов России характерна циркуляция голарктического подвида возбудителя. После 2011 г. на территориях Алтайского, Красноярского краев и Республики Алтай выделяются штаммы как голарктического, так и среднеазиатского подвидов.

Актуальность

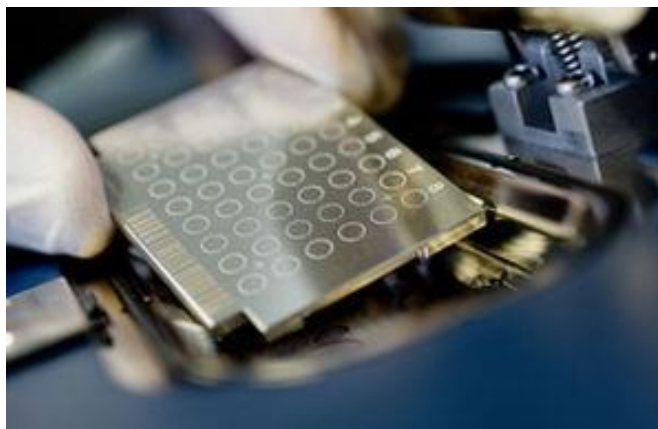
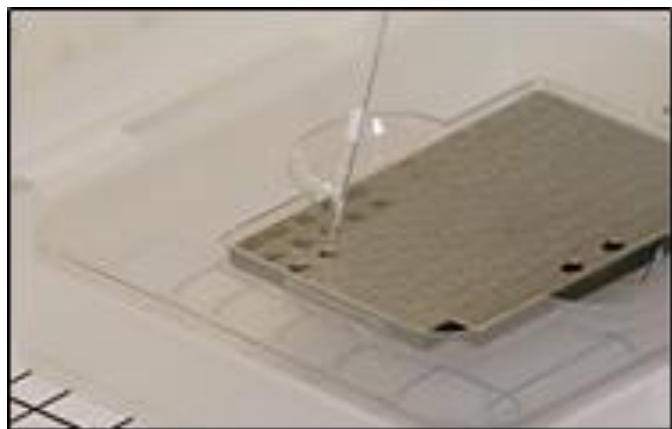
- С 2014 года согласно МР 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I - II групп патогенности» введен в лабораторную практику метод времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS), позволяющий идентифицировать бактерии путем сравнения масс-спектров белков бактериальных клеток с эталонными спектрами, хранящимися в базе данных.
- Он является быстрым, надежным и экономически эффективным методом для рутинного применения в клинических микробиологических лабораториях.

Дополнение базы данных программ

- Коммерчески доступные базы данных, поставляемые с масс-спектрометрами на территорию России, не содержали спектров микроорганизмов I - II групп патогенности, в том числе и возбудителя туляремии.
- Поэтому первым этапом работы стало дополнение базы данных, поставляемой с программным обеспечением масс-анализатора Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия), референсными белковыми спектрами *F. tularensis* разных подвидов.
- На втором этапе исследования определялась возможность идентификации микроорганизмов вида *F. tularensis* с использованием расширенной базы данных референсных спектров.

Материалы и методы

- Для идентификации *F. tularensis* использовалась приборная база **Microflex LT** («Bruker Daltonics», Германия).



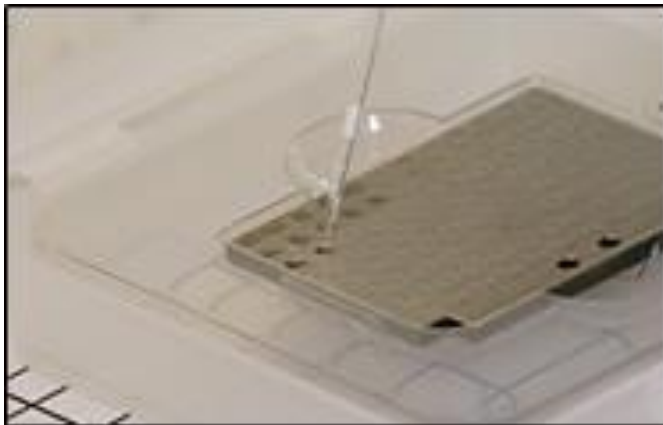
Получение обеззараженных белковых экстрактов

- Для исследования использовалась чистая культура микроорганизма, забранная в экспоненциальной фазе роста (24-х часовая культура).
- Далее получали экстракт, путем обработки суспензии культуры спиртом с последующей экстракцией муравьиной кислотой и ацетонитрилом. («Набор реагентов для подготовки образцов биопроб с целью последовательного анализа масс-спектрометрией (MALDI TOF- проба», производство НПФ «Литех»). Таким образом, удавалось достичь стерильности исследуемых образцов.
- Далее образцы наносились на специальный чип



Внесение чипа в прибор

- Чип с нанесенными на него образцами помещался в масс-спектрометр. После набора прибором вакуума, проводили калибровку с помощью калибровочного стандарта. После этого приступали к сбору спектров в автоматическом режиме.

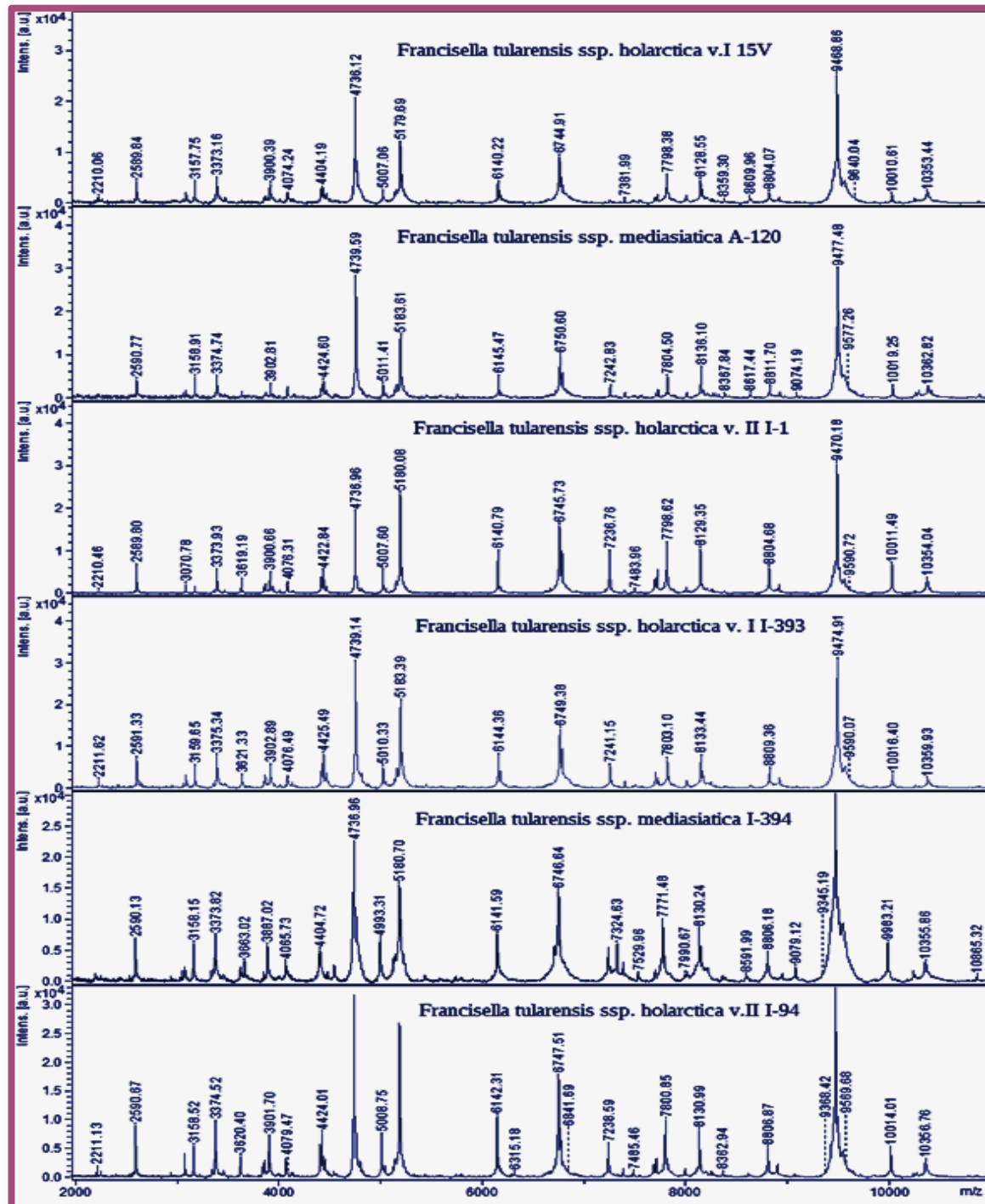


Учет значений SV (Score value, индекса совпадения)

№	Значение SV (индекса совпадения)	Заключение о таксономической принадлежности
1	Более 2,3	Достоверная идентификация до вида
2	Менее 2,3, но более 2,000	Достоверная идентификация до рода, вероятная идентификация до вида
3	1,7 – 2,0	Вероятная идентификация до рода
4	Менее 1,7	Недостоверный результат

Результаты

- ▶ Созданный набор референсных спектров шести штаммов **F.tularensis** четырех подвидов импортировали в базу MALDI Biotyper 3,0.
- ▶ Каждый масс-спектр представлял собой сумму 72 одиночных спектров, полученных в процессе анализа образца, нанесенного на чип в 12 повторах.



Дополнение базы данных

- Созданные масс-спектры 6 штаммов (3 - подвида *holarctica* и по одному – подвидам *mediasiatica*, *tularensis*, *novicida*) вошли в базу данных федерального уровня:
- «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDY Biotyper», свидетельство № 2016620345 от 15.03.2016 г.

Апробация расширенной базы данных

- С использованием расширенной базы данных MALDI Biotyper 3.0 идентифицировано 39 штаммов *F. tularensis*.
- Для этой цели образцы наносились в пятикратной повторности. Масс-спектрометрия белковых профилей показала значения SV (score value) от 2,36 до 2,84, все штаммы определены до вида.
- Значимых различий в белковых профилях между штаммами разных подвидов не выявлено.

Масс-спектрометрия при идентификации штаммов *F. tularensis*

- За период с 2016 г. по 2018 г. исследовано 90 свежесыводенных и коллекционных штаммов туляремийного микроба.
- Из них 17 штаммов по данным биохимических и генетических тестов отнесены к среднеазиатскому подвиду, 73 к голарктическому подвиду.
- Белковое профилирование с применением MALDI-TOF-MS установило достоверную идентификацию микроорганизма до вида *Francisella tularensis* (SV находились в пределах 2,21 – 2,63).

Заключение

- Формирование референсных библиотек и расширение базы данных MALDI Biotyper 3.0 для идентификации и типирования патогенов показало возможность достоверной идентификации микроорганизмов **до вида *Francisella tularensis***.
- Результаты масс-спектрометрии показали 100 % совпадение с бактериологическим и молекулярно-генетическим методом.
- Значимых различий в белковых профилях между штаммами разных подвидов не выявлено, поэтому внутривидовую дифференциацию по подвиду и биовару провести не удалось.

Заключение

- Учитывая высокую производительность, простоту и низкую стоимость пробоподготовки, методика MALDI-ToF MS на приборе **Microflex LT** применима в лабораторной диагностике туляремии **на этапе видовой идентификации.**
- Вопрос применения масс-спектрометрического исследования нативного материала (полевого и клинического) для обнаружения наличия возбудителя туляремии требует своего дальнейшего изучения.

**Благодарю за
внимание**