

**Федеральное казённое учреждение здравоохранения  
«Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека**

*На правах рукописи*

**Ульшина Диана Васильевна**

**Выявление и межвидовая дифференциация штаммов возбудителя бруцеллеза с  
использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии**

03.02.03 – микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
член-корреспондент РАН,  
доктор медицинских наук, профессор  
**Куличенко Александр Николаевич**

Ставрополь - 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1 Общие представления о таксономическом положении микроорганизмов рода <i>Brucella</i> spp. ....	13
1.2 Методы детекции и типирования возбудителя бруцеллеза .....	15
1.3 Выявление и субтипирование микроорганизмов рода <i>Brucella</i> spp. с использованием молекулярно-генетических методов исследования .....	18
1.4 Применение метода MALDI-TOF MS для анализа патогенных бактерий .....	22
1.4.1 Времяпролетная масс-спектрометрия как метод исследования возбудителей инфекционных болезней на основании анализа белковых молекул.....	22
1.4.2 Использование MALDI-TOF MS для характеристики микроорганизмов рода <i>Brucella</i> spp. ....	32
1.5 Заключение по главе 1 .....	39
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	41
2.1 Объекты исследования.....	41
2.1.1 Штаммы микроорганизмов .....	41
2.1.2 Питательные среды, условия культивирования.....	46
2.1.3 Обеззараживание и белковая экстракция культур <i>Brucella</i> spp. ....	47
2.1.4 Пробоподготовка и обеззараживание образцов крови, искусственно контаминированных бруцеллами .....	48
2.1.5 Пробоподготовка и обеззараживание проб крови биопробных животных, зараженных возбудителем бруцеллеза .....	49
2.1.6 Пробоподготовка и обеззараживание клинического материала .....	50
2.1.7 Подготовка и анализ белковых экстрактов методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией .....	51
ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА СТАНДАРТИЗИРОВАННОГО АЛГОРИТМА ИДЕНТИФИКАЦИИ И ВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ БРУЦЕЛЛ МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР.....	56
3.1 Оптимизация и стандартизация методики обеззараживания и подготовки проб культур возбудителя бруцеллеза при работе методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией.....	56
3.2 Подготовка культур возбудителя бруцеллеза для исследования методом MALDI-TOF MS, экспериментальное обоснование использования агара Альбими.....	58

3.3 Формирование комплекса критериев для оценки качества референсных масс-спектров чистых культур возбудителя бруцеллеза.....	61
3.4 Разработка базы референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI BioTyper .....	62
3.5 Проведение межвидовой дифференциации штаммов <i>Brucella</i> spp. на основе данных MALDI-TOF MS .....	67
3.6 Определение на масс-спектрах штаммов <i>Brucella</i> spp. сигналов, специфичных для возбудителя бруцеллеза .....	77
3.7 Заключение по главе 3 .....	82
<b>ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА В ОБРАЗЦАХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.....</b>	<b>83</b>
4.1 Оценка возможности детекции <i>Brucella</i> spp. в модельных клинических образцах методом MALDI-TOF MS.....	83
4.2 MALDI-TOF MS анализ белковых профилей экстрактов крови.....	88
4.3 Оценка возможности применения времяпролетной масс-спектрометрии для анализа клинического материала .....	93
4.4 Биоинформационный анализ масс-спектров белковых экстрактов проб крови, потенциально содержащей возбудитель бруцеллеза .....	97
4.5 Заключение по главе 4 .....	100
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>102</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>109</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....</b>	<b>110</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>111</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>113</b>
<b>СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....</b>	<b>128</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А База референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI BioTyper .....</b>	<b>131</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Б Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper .....</b>	<b>132</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность и степень разработанности темы.** По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), бруцеллез - один из самых значимых и распространенных зоонозов, вызывающий значительную заболеваемость в популяциях крупного и мелкого рогатого скота, а также среди людей [112, 105]. В Российской Федерации наиболее эпидемиологически неблагоприятные по бруцеллезу – административные субъекты с развитым животноводством (Северо-Кавказский, Южный и Сибирский федеральные округа), на долю которых приходится от 70 до 90 % случаев заболеваний бруцеллезом в стране [21].

Известно, что бактерии рода *Brucella* относят к внутриклеточно паразитирующим микроорганизмам, современная систематика которых насчитывает 12 видов: *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae*, *Brucella melitensis*, *Brucella ceti*, *Brucella pinnipedialis*, *Brucella microti*, *Brucella inopinata*, *Brucella papionis*, *Brucella vulpis*. Ввиду большой эпидемиологической значимости патогена, выделение культуры *Brucella* spp., а также ее идентификация с определением видовой принадлежности имеет важное значение при проведении лабораторной диагностики бруцеллеза [16]. Регламентированные методы видовой идентификации, основанные на изучении фенотипических свойств, позволяют дифференцировать возбудителя бруцеллеза до уровня биовара, но характеризуются трудоемкостью, длительностью и, в ряде случаев, неспецифичностью анализа [84], а также требуют проведения работ с живыми культурами возбудителя.

Одна из задач совершенствования лабораторной диагностики бруцеллеза заключается в разработке алгоритмов идентификации бруцелл с привлечением новых методов исследования, позволяющих осуществлять не только молекулярно-генетическую, но и протеомную характеристику выделяемых культур на видовом и штаммовом уровнях.

Времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS) является современным экспресс-методом индикации и дифференциации микроорганизмов, обеспечивающим прямой анализ белковых экстрактов микробной клетки, что повышает эффективность лабораторной диагностики инфекционных болезней [95, 126]. Чувствительность метода

MALDI-TOF MS для разных патогенов составляет  $n \cdot 10^3$ - $10^6$  м.к./мл, что позволяет проводить индикацию и идентификацию микроорганизмов. Поэтому MALDI-TOF MS можно рассматривать в качестве альтернативного подхода комплексу традиционных методов детекции микроорганизмов, в частности бактериологическому, иммунологическому, генетическому (метод полимеразной цепной реакции) [103].

К настоящему моменту использование MALDI-TOF масс-спектрометрии в лабораторной диагностике инфекций сводится к выявлению специфичных сигналов – биомаркеров [74] и сравнению полученных белковых профилей с базой данных референсных масс-спектров (например, пакет программ BioTyper (Bruker Daltonics, Германия). Ограничивающим фактором для проведения идентификации в отношении культур возбудителя бруцеллеза является отсутствие масс-спектров *Brucella* spp. в коммерческих базах данных. Анализ видов и биоваров *Brucella* spp. в программе MALDI BioTyper позволил выявить ряд различий между полученными результатами и классической таксономией, основанной на фенотипических признаках [86]. Сложность проведения межвидовой дифференциации, например, для штаммов *B. abortus* и *B. melitensis*, обусловлена в первую очередь, близостью соответствующих масс-спектров, что существенно затрудняет однозначную дискриминацию представителей этих видов [127].

Данные научных исследований свидетельствуют, что специфичность идентификации культур бруцелл методом MALDI-TOF MS варьирует в пределах от 90 % до 99,9 % [127]. Повышение эффективности идентификации микроорганизмов *Brucella* spp. возможно на основе выявления эволюционно консервативных рибосомных белков – биомаркерных ионов (identifying biomarker ions-IBIs). Важно отметить, что помимо пиков, соответствующих биомаркерам, на масс-спектрах встречаются переменные сигналы, позволяющие проводить дифференциацию бруцелл на межвидовом/внутривидовом уровнях [103].

В свою очередь, обработка масс-спектров и обнаружение биомаркеров являются ключевыми этапами статистического анализа для интерпретации полученных MS данных. Многообразие современных биоинформационных программных продуктов обуславливает необходимость решения широкого круга задач по обработке и интерпретации MALDI-TOF MS данных. Очевидно, что наибольшей востребованностью обладает программное обеспечение, содержащее комплекс функциональных

возможностей для анализа информации. Среда языка программирования «R» представляет собой общедоступную универсальную платформу, которая успешно совмещает алгоритмы поиска и выявления аналитически значимых сигналов (биомаркеров) с возможностью проведения различных видов кластеризации большого массива данных, а также последующей визуализацией результата [60]. Представляет интерес использование среды языка программирования «R» для интерпретации MALDI-TOF MS данных при исследовании штаммов возбудителя бруцеллеза.

Применение MALDI-TOF MS для выявления возбудителей особо опасных инфекций (ООИ) в клиническом материале на настоящий момент включает этап выделения культуры. Поэтому длительность и сложность работ по изоляции возбудителя бруцеллеза из исследуемого материала значительно осложняют реализацию метода на практике [149]. В зарубежных публикациях приводятся данные о возможности использования крови и цереброспинальной жидкости в протеомном профилировании для диагностики инфекционных болезней [40]. При этом идентификация бактерий методом MALDI-TOF MS с помощью программного пакета BioTyper остается сложной задачей [109]. Низкие значения коэффициента совпадения (Score) полученного масс-спектра с референсными файлами из базы данных при анализе клинических образцов, могут быть обусловлены, в первую очередь, присутствием в исследуемом материале фракций небактериальных белков, существенно влияющих на качество масс-спектров. Для преодоления этой проблемы необходимо совершенствование методов пробоподготовки и биоинформационные алгоритмы для интерпретации полученных данных [70, 75]. Отмечается, что использование MALDI-TOF MS для ускоренного выявления бруцелл без этапа выделения чистой культуры или подрачивания бактериальной массы на стадии пробоподготовки – перспективное востребованное направление совершенствования диагностики [154].

Таким образом, в настоящее время внедрение MALDI-TOF масс-спектрометрии в систему лабораторной диагностики бруцеллеза требует разработки стандартизированных подходов к пробоподготовке, формированию и оценке масс-спектров, интерпретации полученных результатов.

**Цель исследования:** разработка методических подходов и алгоритмов анализа для детекции и межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием биоинформационных технологий.

**Задачи исследования:**

1. Сформировать коллекцию штаммов *Brucella* spp. разного таксономического положения с целью исследования variability белковых профилей бактериальных экстрактов культур возбудителя методом времяпролетной масс-спектрометрии.
2. Создать электронную базу референсных масс-спектров штаммов *Brucella* spp. в среде программы Biotyper (Bruker Daltonics, Германия).
3. Разработать алгоритм анализа клеточных белков для идентификации возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии:
  - оптимизировать методику обеззараживания и подготовки проб культур бруцелл для исследования методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией;
  - выявить на масс-спектрах специфичные сигналы, поиск биомаркеров для межвидовой дифференциации *Brucella* spp.
4. Изучить зависимость основных параметров масс-спектров от питательных сред и условий культивирования возбудителя бруцеллеза при исследовании методом MALDI-TOF MS.
5. Обосновать экспериментальную возможность индикации *Brucella* spp. в модельных гемокультурах без выделения чистой культуры или накопления возбудителя с помощью времяпролетной масс-спектрометрии.
6. Дать характеристику масс-спектров экстрактов крови биопробных животных при экспериментальном бруцеллезе с использованием современных программных пакетов в среде языка программирования «R».
7. Разработать эффективный алгоритм биоинформационного анализа, позволяющий проводить межвидовую дифференциацию *Brucella* spp. на основании анализа белковых профилей возбудителя.
8. Провести исследование особенностей масс-спектрометрических профилей крови больных бруцеллезом людей с использованием времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией для специфической индикации *Brucella* spp.

### Научная новизна

Впервые создана электронная база референтных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза для идентификации и дифференциации изолятов *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*.

Впервые определены качественные и количественные характеристики масс-спектров в зависимости от используемой питательной среды с экспериментальным обоснованием применения агара Альбими при подготовке культур возбудителя бруцеллеза.

Разработан алгоритм идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, включающий анализ совокупности сигналов, специфичных для представителей *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*.

Разработана методика, включающая процедуру получения суспензии лейкоцитов, позволяющая проводить обеззараживание и пробоподготовку крови, подозрительной на инфицирование возбудителя бруцеллеза для анализа методом времяпролетной масс-спектрометрии.

Впервые показана возможность выявления специфичных маркеров возбудителя бруцеллеза в крови методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или подращивания возбудителя в образце на стадии пробоподготовки. Охарактеризован комплекс аналитически значимых сигналов – биомаркеров, позволяющих проводить дифференциацию белковых профилей образцов крови больных бруцеллезом от масс-спектров проб крови условно здоровых людей.

Показана эффективность использования среды языка программирования «R» в сочетании с программным обеспечением (ПО) «Mass-Up» для комплексной биоинформационной обработки данных времяпролетной масс-спектрометрии при индикации и идентификации *Brucella* spp.

Предложен алгоритм биоинформационного анализа MALDI-TOF MS данных в среде языка программирования «R», позволяющий дифференцировать образцы крови больных бруцеллезом от условно здоровых людей. Используемый комплекс программных средств позволил обеспечить два необходимых критерия качества дифференциации анализируемых объектов: компактность групп и их дискретность.



### **Теоретическая и практическая значимость**

Создана пополняемая электронная база белковых профилей референсных штаммов и клинических изолятов возбудителя бруцеллеза (n=96), циркулировавших на территории Ставропольского края, Республик Дагестан, Ингушетия, Чечня, Кабардино-Балкария, Северная Осетия - Алания и Калмыкия «База референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI BioTyper» (ФИПС № 2017621336, от 20.11.2017 г., Приложение А). На основании анализа белковых профилей экстрактов культур бруцелл в среде Biotyper DB Offline Classification с применением сформированной базы данных показана высокая эффективность применения метода MALDI-TOF MS для достоверной идентификации и типирования культур возбудителя бруцеллеза. – Федеральный уровень внедрения.

Масс-спектры бактериальных экстрактов 23 культур *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis* включены в электронную базу данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper» (ФИПС № 2016620345, от 15.03.2016 г., Приложение Б), которая может быть использована для идентификации и таксономической классификации изолятов возбудителя бруцеллеза до вида. – Федеральный уровень внедрения.

В лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора при выполнении диагностических исследований в рамках деятельности референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза и научной работе используются сведения из электронной базы белковых профилей экстрактов культур бруцелл в среде Biotyper DB Offline Classification (II группа патогенности) для идентификации и дифференциации изолятов возбудителя (Акт внедрения №1 от 03.12.2018 г.)

Разработаны Методические рекомендации «Порядок подготовки и анализа проб крови, подозрительной на присутствие возбудителя бруцеллеза, при работе методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией» (Одобрены ученым советом ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, утверждены директором института 30.09.2016 г., протокол № 9) и Методические рекомендации «Биоинформационный анализ масс-спектрометрических данных с использованием программных пакетов языка программирования «R» при исследовании проб крови больных или подозрительных по заболеванию бруцеллезом

людей» (Одобрены ученым советом ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, утверждены директором института 26.09.2018 г., протокол № 6).

### **Методология и методы исследования**

В соответствии с целью и задачами работы для исследования бактериальных взвесей культур *Brucella* spp., искусственно контаминированных возбудителем бруцеллеза проб крови от человека (модельные клинические образцы), крови инфицированных в условиях эксперимента мышей, проб клинического материала (кровь) от людей с острой формой заболевания использовали микробиологические и физико-химические методы. Оценку возможности детекции бруцелл в модельных клинических образцах крови условно здоровых людей проводили с помощью микроскопических методов. Межвидовую дифференциацию штаммов на основе белкового профилирования близкородственных видов бруцелл, дифференцирование образцов экспериментальной группы (масс-спектры крови больных бруцеллезом людей) от отрицательного контроля (масс-спектры условно здоровых людей: не больных, не переболевших бруцеллезом и не вакцинированных против этой инфекции) осуществляли с помощью статистических подходов (PCA, MDS).

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Охарактеризован комплекс из 17 пиков, специфичных для шести видов бруцелл ( $m/Z \pm 5$  Da): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 5036, 4545, 4770, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068; установлены общие сигналы для представителей каждого вида *Brucella* spp., которые могут быть использованы при межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза.

2. Разработанная «База референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI BioType» позволяет эффективно проводить идентификацию бруцелл в режиме реального времени методом MALDI-TOF MS.

3. Предложенный вариант MALDI-TOF MS анализа позволяет детектировать специфичные для бруцелл маркеры ( $m/Z \pm 5$  Da): 2422, 3268, 3336, 3696, 5360, 6672, 7048, при прямом анализе материала (крови) от больных без этапа обогащения или культивирования возбудителя.

4. Разработанная методика пробоподготовки образцов крови для индикации возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, включающая процедуру получения суспензии лейкоцитов посредством центрифугирования и отмывки

с последующей обработкой раствором этилового спирта, обеспечивает как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов для выполнения анализа.

5. Алгоритм биоинформационного анализа MALDI-TOF MS данных в среде языка программирования «R» позволяет идентифицировать в белковых профилях образцов крови специфичные для бруцелл маркеры при исследовании материала от людей.

#### **Степень достоверности и апробация результатов работы:**

1. Результаты диссертационной работы получены с использованием современного поверенного оборудования, микробиологических методов исследования с последующей статистической обработкой данных с применением программного обеспечения «Mass-Up» и прикладных пакетов в среде языка программирования «R».

2. Материалы диссертационной работы были представлены: на X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», доклад занял I место в номинации «Лучшая работа молодого ученого» (23-27 октября 2018 г., г. Москва); II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (05-06 апреля 2017 г., г. Ставрополь); IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (5-7 декабря 2017 г., г. Иркутск); VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (08-10 декабря 2015 г., г. Санкт-Петербург); VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины» (22-24 октября 2014 г., г. Ставрополь); итоговых научно-практических конференциях ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (2015-2019 гг.).

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 20 научных работ, из них 5 в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, зарегистрированы 2 электронные базы данных.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 134 страницах компьютерного текста, содержит 2 таблицы и 29 рисунков. Состоит из введения, обзора литературы, двух глав собственных исследований, включающих описание материалов и методов исследований и экспериментальную часть, заключения, выводов. Список литературы содержит 164 источника, из них: 34 – отечественных и 130 – зарубежных.

### **Место выполнения диссертационной работы и личный вклад автора**

Работа подготовлена на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора при выполнении плановой НИР: «Совершенствование и внедрение методов идентификации и типирования патогенных биологических агентов на основе масс-спектрометрии» (№ гос. регистрации АААА-А16-116022510098-1). Автор участвовал в формулировании актуальности, цели и концепции исследования, в проведении сбора и анализа литературных данных в рамках проблематики, планировании и постановке экспериментов, апробации и внедрении использованных в работе технологий, обработке, анализе и интерпретации результатов, внедрении их в практику. Предварительная подготовка проб культур возбудителя бруцеллеза и клинического материала для MALDI-TOF исследования проведена при участии сотрудников лаборатории бруцеллеза в рамках темы плановой НИР. Разработка концепции исследования, комплексный анализ и интерпретация данных MALDI-TOF MS исследования проведены совместно с канд. хим. наук Д.А. Ковалевым. Формирование раздела базы данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper» референсных масс-спектров 23 штаммов *Brucella* spp. проводилось совместно со специалистами ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, ФБУНГНЦПМБ Роспотребнадзора, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

## ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Общие представления о таксономическом положении микроорганизмов рода *Brucella* spp.

Бруцеллез (синонимы: мальтийская лихорадка, средиземноморская лихорадка, волнообразная лихорадка, болезнь Банга) – бактериальная инфекционно-аллергическая болезнь общая для человека и животных с острым хроническим течением, характеризующаяся интоксикацией и преимущественным поражением органов и систем организма. У людей протекание болезни может сопровождаться разнообразными симптомами, различающимися от легкого гриппоподобного до серьезных осложнений со стороны нервной системы, костно-мышечной системы и сердца [146].

Первое упоминание бруцеллеза как «средиземноморская желудочная лихорадка» встречается в воспоминаниях врача британской армии во время его нахождения на острове Мальта в 1860 г. Впервые изоляты был выделены Дэвидом Брюсом в 1887 г. из селезенок солдат, умерших от лихорадки [117], давшим бактериям название *Micrococcus melitensis*. Впоследствии микроорганизму было присвоено имя *Brucella melitensis*, а заболевание получило название Мальтийская лихорадка.

Во второй половине XX века сходные бактерии, изолированные от больных животных, было решено объединять в один род, который в честь первооткрывателя получил название *Brucella*, а вызываемое ими заболевание – бруцеллез [150].

Возбудитель бруцеллеза относится к роду *Brucella*, входящего в группу микроаэрофильных, аэробных, грамотрицательных палочек и кокков, по схеме идентификации бактерий Берджи, принадлежит к семейству *Brucellaceae* порядка *Rhizobiales*. Бруцеллы как представители *Alphaproteobacteria* имеют филогенетическое родство с патогенами и симбионтами, такими как *Rhizobium* и *Agrobacterium*, внутриклеточными паразитами животных (*Bartonella* и *Rickettsia*), а также оппортунистическими и свободноживущими бактериями (*Ochrobactrum* и *Caulobacter*).

Таксономическая классификация микроорганизмов *Brucella* spp. формировалась на представлении о существовании шести классических видов бруцелл (*Brucella* (*B.*) *melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* и *B. canis*), которые подразделялись на биовары (биотипы). Параллельно с этим существовала другая систематическая

классификация, основывающаяся на высокой степени гомологии ДНК бруцелл, наблюдаемой при ДНК-ДНК гибридизации. Оценка гомологичности ДНК (совпадение последовательности оснований в молекулах нуклеиновых кислот) штаммов *Brucella* spp., по результатам экспериментов для различных видов бруцелл составила 90 % [14]. Было опровергнуто существование для представителей рода *Brucella* шести отдельных самостоятельных видов и предложено выделять только один вид *B. melitensis*, который подразделялся на биовары (*B. melitensis biovar abortus*, *B. melitensis biovar suis* и т. д.) [107]. Таксономическую систему приняли GenBank и UKNCC (United Kingdom National Culture Collection). В 1986 году комитетом по таксономии бруцелл было решено принять моноспецифическую систему классификации бруцелл как единственно таксономически обоснованную, во избежание возникновения путаницы с сохранением классических видов *Brucella* spp.

Используемая классификация была пересмотрена в 2006 г., на основании информации о видовых особенностях структуры генома *Brucella* spp. [72]. Первые полные геномы были секвенированы для штаммов *B. melitensis* и *B. suis* [62, 114], а вскоре и *B. abortus* в 2002 г. [77]. Было установлено, что наиболее близки по структуре, организации и нуклеотидной последовательности геномы микроорганизмов трех видов – *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, при этом гомология по аминокислотным последовательностям составляет более 99 % [130]. Для остальных видов бруцелл, степень гомологичности, независимо от естественной L-трансформации и степени диссоциации, варьирует от 88 до 100 % [157]. По мнению зарубежных исследователей по сравнению с классическими видами бруцелл *B. microti*, *B. inopinata* отличаются высокой метаболической активностью подобно представителям рода *Ochrobactrum*, близкородственных в пределах семейства *Brucellaceae* класса альфа-протобактерий [133].

Несмотря на высокую гомологичность ДНК классических видов бруцелл (более 90 %), геном представителей вновь выделенных видов содержит отличия, встречающиеся так же у представителей рода *Ochrobactrum*, почвенных бактерий *Paracoccus denitrificans*, *Agrobacterium* и *Sinorhizobium* [133].

Развитие молекулярно-биологического генотипирования в последующие годы способствовало уточнению номенклатуры *Brucella* spp. Были выделены изоляты новых видов бруцелл от различных животных, в частности грызунов, различных видов лягушек, красных лис, которые были отнесены к отдельным видам *Brucella* spp. [159].

К настоящему моменту род *Brucella* представлен 12 самостоятельными видами, различающимися по генетическим, биохимическим, антигенным и вирулентным характеристикам: *B. melitensis* преимущественно поражает коз и овец с возможной миграцией на крупный рогатый скот и свиней [58, 113] (3 биовара), *B. abortus* насчитывает 7 биоваров, основной хозяин – крупный рогатый скот [97, 102]; *B. suis* – 5 биоваров, основные носители – свиньи (1, 2, 3 биовары), зайцы – 2 биовар, северные олени – 4 биовар, мышевидные грызуны – 5 биовар [136]; *B. neotomae* (кустарниковые крысы) [54]; *B. ovis* (вызывает эпидидимиты и орхиты у баранов) [139]; *B. canis* (собаки) [87]; *B. ceti* (китообразные) [158]; *B. pinnipedialis* (ластоногие) [97]; *B. microti* (от серой полевки) [132]; *B. inopinata* (выделен из грудного имплантата 71-летней пациентки с клиническими признаками бруцеллеза) [131, 164]. В 2014 году опубликовали информацию о штамме, выделенном от павиана, который исследователями был отнесен к отдельному виду *B. rapionis*, но генетически близок был к виду *B. ovis* [154]. Scholz с соавторами опубликовали результаты исследования, в ходе которого были получены бактериальные изоляты от двух особей красных лис. Поскольку сходство исследованных геномов с бруцеллами превышало 80 %, а идентичность нуклеотидных и аминокислотных последовательностей при сравнении с видом *B. melitensis* составляла 97 % и 98 % соответственно, новые штаммы были выделены в отдельный вид *B. vulpis* (рыжая лисица) [133].

## 1.2 Методы детекции и типирования возбудителя бруцеллеза

Детекцию возбудителя, выявление его ДНК, а также антител и антигенов в пробах клинического материала от людей проводят с использованием бактериоскопических (световая и люминесцентная микроскопия), бактериологических (получение культуры, идентификация и видовая дифференциация штаммов), биологического (заражение биопробных животных), иммуносерологических (реакции агглютинации Райта, Хеддльсона, Кумбса, РНГА, ИФА) и молекулярно-генетического (ПЦР) методов [16].

Изоляция бруцелл из проб клинического материала представляет собой наиболее достоверный критерий для постановки диагноза «бруцеллез», несмотря на то, что это достаточно трудоемкий и не всегда дающий положительный результат подход [5]. Это обусловлено тем, что при данном заболевании выход бруцелл в кровь (бактериемия)

происходит одновременно с началом клинических проявлений. Последующая гематогенная диссеминация патогена приводит к развитию в органах метастатических очаговых изменений [24].

Так, эффективность выделения культуры *B. melitensis* из крови больных составляет 62-90 % случаев, а чувствительность бактериологического метода при острой форме бруцеллеза – около 50-70 % [46]. Положительный результат при выявлении культуры в пробе крови больного бруцеллезом, вызванным *B. abortus*, получают лишь в 5-15 %, что определяется кратковременностью бактериемии при заболевании, вызванном данным видом возбудителя [4]. Наибольшая частота высеваемости культур бруцелл характерна для острой формы заболевания. При хроническом бруцеллезе эффективность использования культурологического метода составляет только 25,9 % случаев [25, 42].

Наибольшая чувствительность при использовании бактериологических методов достигается при выделении культур из пунктатов и проб костного мозга, что приводит к положительным результатам в 92 % случаев против 70 % при анализе культуры крови [4]. Однако, данный подход рекомендуется применять для больных с лихорадками неустановленного генеза или при подозрении на хроническую форму заболевания [11].

Известно, что микроорганизмы рода *Brucella* проявляют медленный рост на питательных средах, особенно в первых генерациях (иногда от 5 до 30 суток после посева). Поэтому использование бактериологического метода, проводимое наравне с современными методами детекции бруцелл в исследуемом материале, является длительным и трудоемким процессом [67]. Внедрение за рубежом современных автоматических систем культивирования, в частности, таких как Bactec, BACT/ALERT, способствовало значительному сокращению продолжительности идентификации возбудителя с 21 до нескольких дней. Вместе с тем В.А. Малов (2011) сообщает, что при детекции бруцелл с использованием современных систем культивирования в 20-30 % случаев диагноз «бруцеллёз» не был подтвержден бактериологически [15]. Кроме того, при использовании культиваторов велика вероятность проведения неверной идентификации *Brucella* spp., которые были отнесены к микроорганизмам *Moraxella phenylpyruvica* и *Haemophilus influenzae* [46].

В случае необходимости выделения бруцелл из материалов, загрязненных посторонней микрофлорой, и при малой концентрации бруцелл проводят заражение биопробных животных исследуемым материалом и по истечении сроков инкубации



возбудителя инфекции вскрывают, делая посевы из органов на питательные среды. Несмотря на высокую достоверность и эффективность биологического метода, его можно охарактеризовать как ресурсозатратный и длительный по времени (более 20 суток) [16].

Принадлежность выделенных культур к роду *Brucella* spp. устанавливают на основании исследования морфологии колоний. Вместе с тем известно, что фенотипические свойства культур возбудителя бруцеллеза наиболее схожи со следующими видами бактерий: *Ochrobactrum anthropi* [156], *Ochrobactrum intermedium* [82], *Haemophilus influenzae* [51], *Bergeyella zoohelcum* [59], *Bordetella bronchiseptica* [163]. В связи с чем, идентификация культур разных видов *Brucella* spp. (особенно полевых изолятов) с использованием общепринятых методик, основанных на определении фенотипических признаков возбудителя, может сопровождаться получением ошибочных результатов.

Дифференциацию культур бруцелл при бактериологическом исследовании осуществляют при помощи специальных тестов, позволяющих оценить следующие свойства: рост в среде повышенной концентрации углекислого газа, производство сероводорода, редуцирующая активность в отношении красок (фуксин и тионин), способность агглютинироваться моноспецифическими сыворотками (*anti-M*, *anti-A*), чувствительность культур бруцелл к диагностическому бактериофагу Тб. Проведение таких тестов представляет собой относительно длительный и достаточно трудоемкий процесс, кроме того результаты дифференциации не всегда однозначны для основных видов возбудителя бруцеллеза.

Принимая во внимание, что культуры бруцелл проявляют медленный рост даже на специальных питательных средах, параллельно детекцию патогена проводят с использованием реакций иммунологического взаимодействия бруцеллезного антигена и специфических антител [23, 37]. На более поздних этапах (более полугода) от начала заболевания количество положительных серологических реакций, в частности при использовании реакции агглютинации и реакции непрямой гемагглютинации, чувствительность которых составляет  $10^8$ – $10^9$  м.к./мл, сокращается [28]. Использование серологических реакций для выявления специфических антител может сопровождаться ложноположительными результатами с другими микроорганизмами (*Yersinia enterocolitica* – серотипы O:3 и O:9, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Francisella tularensis*, *Salmonella typhimurium*) [17].

Детекцию бруцелл в материале, содержащем постороннюю микрофлору, осуществляют с помощью иммунофлуоресцентного анализа (МФА), чувствительность которого составляет  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  м.к./мл. [3]. Для успешного использования этого метода необходимо предварительное концентрирование бактерий из нативного материала посредством центрифугирования, фильтрации. Положительный результат МФА позволяет дать предварительный положительный ответ, но метод характеризуется низкой производительностью при большом количестве проб [5].

Из большого многообразия серологических тестов иммуноферментный анализ (ИФА) представляет собой наиболее специфичный, чувствительный, экономичный и простой в исполнении метод детекции возбудителя бруцеллеза [18]. Так, использование системы ИФА-анализа позволило провести не прямое выявление антител к возбудителю бруцеллеза в сыворотке крови человека при анализе клинического материала, поступившего из двух эндемичных по бруцеллезу районов Ирана [143]. По данным авторов, чувствительность и специфичность применяемой системы составляла 95,7 % и 97,8 % соответственно. На основании данных ИФА было установлено, что выявление IgM более информативно для острой формы бруцеллеза, тогда как присутствие IgG может быть использовано для диагностики подострой и хронической инфекции [100, 111]. Исходя из ранее изложенного, можно заключить, что иммуносерологические методы позволяют осуществлять детекцию патогена без возможности проведения меж- и внутривидовой дифференциации возбудителя бруцеллеза.

### **1.3 Выявление и субтипирование микроорганизмов рода *Brucella* spp. с использованием молекулярно-генетических методов исследования**

К наиболее перспективным методам детекции и субтипирования изолятов возбудителя можно отнести молекулярно-генетические, позволяющие проводить выявление и анализ генетических характеристик фрагментов генома в исследуемом материале: полимеразная цепная реакция (ПЦР), MLVA- типирование (мультилокусный анализ вариабельных тандемных повторов), секвенирование.

Необходимость использования точных и быстрых методов выявления и типирования изолятов бруцелл в рамках решения эпидемиологических задач определила темпы развития молекулярно-генетических методов изучения возбудителя бруцеллеза. Введение

в эксплуатацию метода гель-электрофореза в пульсирующем поле способствовало изучению длины фрагментов бактериальных геномов [38]. На основании данных рестрикционного анализа полиморфизмов было подтверждено, что геном каждого штамма представлен как консервативными, так и уникальными вариabельными фрагментами.

К настоящему моменту детекцию и последующую идентификацию, а также лабораторное подтверждение диагноза проводят молекулярно-генетическими методами исследования, в частности, ПЦР [7, 142]. Уникальность последовательностей ДНК, специфичных для каждого вида *Brucella* spp., позволяет их использовать в качестве мишеней в ПЦР-анализе при типировании штаммов возбудителя.

Чувствительность и специфичность ПЦР обеспечили возможность выявления возбудителя бруцеллеза у 38,8 % больных (хроническая стадия болезни) по данным исследований Ю.К. Кулакова с соавт. [2010] [12]. П.Н. Попов с соавт. [2007] опубликовали результаты обследования группы пациентов, для которых была отмечена положительная реакция на бруцеллез, при полном отсутствии клинической картины болезни [22]. Вместе с тем, ПЦР позволил провести выявление ДНК возбудителя бруцеллеза для всех больных.

За последнее время наиболее востребованы методы ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ), к достоинствам которого можно отнести достоверность, специфичность, минимальную возможность контаминации по сравнению с другими видами ПЦР. Обзор литературы позволяет говорить о высокой эффективности ПЦР-РВ не только для детекции микроорганизмов рода *Brucella* [10, 125], но и для типирования патогена [9, 19].

На основании анализа публикаций можно сделать вывод о том, что для выявления и дифференциации отдельных видов и биоваров штаммов возбудителя бруцеллеза наиболее перспективным в данном направлении представляется применение метода ПЦР, использующего для дискриминации в качестве маркеров генетические мишени. Однако, методики, используемые для детекции, а также определения видовой и биоварной принадлежности бруцелл методом ПЦР, имеют ряд ограничений, в частности, система Bruce-Ladder не позволяет провести однозначную дифференциацию видов *B. suis* и *B. canis*, применение системы AMOS будет эффективным только для выявления и типирования представителей *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*.

К методам детекции и идентификации возбудителя бруцеллеза относится также метод LAMP (от англ. Loop mediated isothermal amplification) или петлевая изотермическая

амплификация). В качестве ДНК-матриц для выявления микроорганизмов рода *Brucella*, как правило, используются гены *omp25* [52, 120, 137], *bscp31* [101, 110, 119] и *IS711* элемент 51, 138 [39, 115]. Применение различных модификаций данного метода характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью реакции не только при анализе культур возбудителя бруцеллеза, но и в образцах клинического и биологического материала.

Для детекции и типирования возбудителя бруцеллеза в настоящее время используют не только подходы, основанные на выявлении методом ПЦР генетических маркеров, специфичных для рода и вида возбудителя бруцеллеза, а также способы детекции полиморфизма единичных нуклеотидов, в частности анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов [61].

Установление видовой принадлежности изолятов возбудителя бруцеллеза с возможностью уточнения их родственных связей наиболее точно в настоящее время позволяет проводить метод MLVA-типирования. Суть метода – сравнительный анализ локусных вариабельных тандемных повторов для двух хромосом патогена. Для генома микроорганизмов *Brucella* spp. отмечено много локусов, содержащих тандемные повторы различной длины, с разным количеством копий повторов в локусах для представителей одного вида. Масштабное исследование штаммов возбудителя бруцеллеза с использованием схем MLVA-16 [130] и MLVA-11 [151], проведенное в 2018 г., позволило сформировать представление о генетической структуре бактерий рода *Brucella*. В ходе анализа была показана возможность применения метода MLVA-генотипирования в качестве эффективного инструмента при отборе штаммов бруцелл для изучения методом полногеномного секвенирования.

Наиболее точная идентификация и субтипирование изолятов бруцелл с возможностью получения полной информации о структуре и организации генома возбудителя, определения уровня экспрессии генов могут быть проведены с помощью современной технологии полногеномного секвенирования (англ. Next Generation Sequencing, NGS) [155]. Изучение генома микроорганизмов рода *Brucella*, прежде всего, позволяет не только определять специфичные гены, которые отвечают за синтез факторов вирулентности, но и выявлять масштабные геномные перестройки, находить единичные нуклеотидные замены, от присутствия которых может зависеть вирулентность бруцелл [72]. Кроме того, исследование структуры и функциональных особенностей генома бруцелл разных видов может способствовать уточнению информации о биологии

возбудителя, в частности, относительно вопросов о предпочтении хозяина. Метод NGS характеризуется высокой воспроизводимостью и разрешающей способностью относительно остальных методов типирования бактериальных патогенов, основанных на непосредственном установлении последовательности генов, но его широкое использование ограничивается относительно высокой стоимостью как самого оборудования, так и расходных материалов.

Использование полногеномного секвенирования в рамках установления межвидовой дифференциации бруцелл позволило выявить огромное количество точечных мутаций, возникающих при репликации ДНК и являющихся следствием замены одного нуклеотида другим. Позиции в геноме популяции, для которых определены замены нуклеотидов, называются однонуклеотидными полиморфизмами (от англ. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP), а метод - SNP-типирование. Высокая дискриминирующая способность SNP-типирования была подтверждена в 2017 г. при дифференциации всех известных видов *Brucella* spp. в соответствии с данными классической таксономии [128].

Очевидно, что для определения межвидовой дифференциации бруцелл, а также установления степени родства изолятов наиболее эффективно использовать SNP-типирование на основании полногеномного секвенирования *Brucella* spp. Однако использование данного метода является длительным и трудоемким, а также предполагает приобретение дорогостоящего оборудования и привлечение высококвалифицированного персонала.

Среди существующего многообразия методов детекции и типирования возбудителя бруцеллеза в настоящее время широкое применение получили молекулярно-генетические методы исследования, в частности ПЦР. Различные варианты ПЦР, например, с электрофоретическим или флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени, позволяют проводить не только выявление возбудителя в клиническом или биологическом материале, но и определение принадлежности бруцелл к отдельному виду и биовару.

## **1.4 Применение метода MALDI-TOF MS для анализа патогенных бактерий**

### **1.4.1 Времяпролетная масс-спектрометрия как метод исследования возбудителей инфекционных болезней на основании анализа белковых молекул**

Масс-спектрометрия – один из современных методов анализа состава химических соединений, который успешно использовали в области химии. Первые эксперименты по применению этой технологии для исследования бактериальных культур провели в 1975 г. J.P. Anhalt и С. Fenselau [41], в ходе которых были получены уникальные масс-спектры для различных микроорганизмов. В начале 80-х г. XX в. развитие технологии десорбции/ионизации, в том числе плазменной десорбции (ПД), лазерной десорбции (ЛД) и бомбардировки быстрыми атомами (ББА) способствовало широкому внедрению белкового профилирования с возможностью выявления уникальных для различных микроорганизмов молекулярных ионов – биомаркеров [80, 147]. Произошедшая в конце прошлого века эволюция видов ионизации, завершившаяся появлением методов MALDI и электрораспыление (ESI), позволила провести MS анализ таких крупных биомолекул как интактные белки [85, 144, 145].

Успешное использование этой технологии способствовало появлению обширного количества вариантов методик пробоподготовки, позволяющих проводить предварительную очистку и экстракцию белковых фракций из бактериальных клеток при анализе методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) [48]. Вместе с тем, опубликованы результаты о возможности о получении спектральных характеристик интактных бактериальных клеток без предварительной обработки перед масс-спектрометрическим анализом [81, 108].

В настоящее время экспресс-идентификация и типирование ООИ методом MALDI-TOF MS – один из наиболее интенсивно развивающихся методов анализа органических соединений, в том числе белков, липидов, нуклеиновых кислот. Основной особенностью ионизации MALDI является относительная «мягкость» процесса перевода молекул вещества, нанесенного на мишень, преимущественно, в виде однозарядных ионов, что позволяет успешно применять метод для анализа структурных характеристик интактных биомолекул [20, 28, 29]. В данном способе ионизации аналит наносят на поверхность

металлической мишени совместно со вспомогательным низкомолекулярным соединением (матрицей) – слабой органической кислотой, содержащей в своей структуре ароматическое кольцо (например, производные бензойной, коричной и др. кислот) и имеющей сильное оптическое поглощение в диапазоне длины волны используемого лазера. Наиболее часто в качестве матрицы используют 2,5-дигидроксibenзойную (DHB),  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричную (CHCA), синапиновую (SA), феруловую (FA) и 2,4-гидроксифенилбензойную кислоты. В ходе анализа экспериментальных данных было показано, что при обнаружении белковых биомаркеров в качестве матрицы наиболее эффективно использовать FA, SA, CHCA, тогда как использование DHB подходит при исследовании гликопептидов и гликопротеинов [73]. Известно, что размер и интенсивность получаемых сигналов напрямую зависят от применяемой в ходе эксперимента матрицы. Руэлле и Вильямсом опытным путем было установлено, что для обнаружения ионов более низкой массы (до 10 кДа) наиболее эффективно применять DHB и CHCA, для регистрации ионов более высокой массы (свыше 15 кДа) целесообразно применять SA, FA [22]. Одновременная сокристаллизация матрицы и анализируемого вещества на мишени является необходимым условием получения на масс-спектрах сигналов высокого разрешения. В качестве растворителя, как правило, берут легко испаряющуюся смесь: ацетонитрил и вода или ацетон и вода, в различных соотношениях.

Образование ионов из молекул анализируемого вещества происходит за счет воздействия импульсов лазерного излучения в условиях глубокого вакуума (до 6 bar) в камере масс-спектрометра [99]. Под воздействием лазерных импульсов молекулы матрицы поглощают излучение, за счет поглощенной энергии происходит локальный разогрев и испарение анализируемого вещества с частичной фрагментацией и ионизацией молекул матрицы [90]. При этом включенные в кристалл матрицы молекулы аналита переходят в газовую фазу без фрагментации, что позволяет регистрировать на детекторе ионы для белковых молекул [44, 148]. В основе метода лежит принцип образования преимущественно однозарядных квазимолекулярных ионов  $[M + H]^+$  из нейтральных молекул в вакууме под воздействием электромагнитного поля с последующим их разделением на аноде-детекторе по массе, что позволяет успешно определять основные классы биополимеров: пептиды, белки, нуклеиновые кислоты, липиды и полисахариды [45]. Получаемая в ходе анализа информация представлена в виде масс-спектра, каждый

пик которого характеризуется значением  $m/Z$  (отношение массы к заряду) и уровнем интенсивности.

Из литературных источников известно, что при сравнительном анализе идентичных фрагментов в целевой области полученных масс-спектрометрических данных наблюдается дрейф – отклонение по величине  $m/Z$  [161]. Помимо «истинных» пиков, соответствующих, например, ионизированным формам белка, MALDI-TOF масс-спектры также содержат сигналы, появляющиеся вследствие дрейфа базовой линии или фонового шума. Предположительно, основные причины отклонения гомологичных сигналов могут быть связаны с калибровкой прибора (аппаратный дрейф) и с изменениями, появившимися в ходе субкультивирования и роста культуры (морфологический дрейф) [35, 36]. Аппаратный дрейф, следуя из изменений в инструментальном состоянии, может привести к разрозненности спектральных данных, полученных за установленный период времени для одного и того же микроорганизма. Увеличению точности результатов анализа способствует повышение ионизации анализируемого вещества за счет фрагментации матрицы, которая имеет высокое оптическое поглощение в ультрафиолетовом диапазоне. Влияние морфологического дрейфа может быть в значительной степени преодолено за счет стандартизации условий культивирования [44, 89, 106].

Как известно, на настоящий момент не существует единого протокола пробоподготовки бактериальных экстрактов при исследовании методом MS, однако большинство используемых методик включают этап экстракции белков муравьиной кислотой, которая обеспечивает получение надежных воспроизводимых результатов при масс-спектрометрическом анализе широкого перечня бактерий. В качестве исходного материала берут бактериальную колонию, которую ресуспендируют в небольшом количестве воды. Обработка полученной смеси раствором этанола с последующим центрифугированием приводит к инактивированию и осаждению бактериального осадка. Экстракция осадка, как правило, проводится раствором муравьиной кислоты в среде ацетонитрила. На следующем этапе аликвоту экстракта наносят на мишень и после высушивания покрывают раствором органической кислоты, используемой в качестве матрицы. Для идентификации и дифференциации бактерий на основе масс-спектрометрического анализа пула основных белков, получаемых в ходе описанной методики, генерируют спектры в диапазоне масс от 2 до 20 кДа. Полученные данные обрабатывают для удаления шума и поиска значений  $m/Z$  аналитически значимых



сигналов. На заключительном этапе в соответствующем программном обеспечении проводится сравнительный анализ масс-спектра неизвестного образца со спектрами аутентичных образцов справочной базы данных. Использование различных статистических алгоритмов для анализа и интерпретации результатов MALDI-TOF MS исследования белковых экстрактов позволяет проводить не только идентификацию, но и дифференциацию близкородственных видов бактерий.

Использование программных приложений известных коммерческих масс-спектрометрических платформ для регистрации и анализа спектров бактериальных изолятов в рамках рутинного рабочего процесса, рекомендованного производителем, не позволяет в полной мере преодолеть трудности меж- и внутривидовой дифференциации. В качестве решения данной проблемы ряд специалистов предлагают изменять условия пробоподготовки, что, очевидно, может негативно повлиять на результаты сравнительного анализа с данными библиотеки, используемой для рутинной диагностики. Альтернативным эффективным способом преодоления трудности меж- и внутривидовой дифференциации близкородственных микроорганизмов является использование расширенной статистической оценки масс-спектрометрических данных, например, путем применения многомерной статистики. Данный подход может быть реализован с помощью программных решений, предлагаемых производителями масс-спектрометрических платформ, в частности ПО «ClinProTools» (Германия, «Bruker») [32]. Вместе с тем, для полноценной интерпретации полученных данных некоторые исследователи предлагают использовать специализированные программы статистического анализа, такие как «Matlab» (The Mathworks Inc.) [30] или находящиеся в открытом доступе языки программирования, в частности язык статистического программирования «R» [31]. К достоинствам использования языков программирования можно отнести, прежде всего, возможность использования широкого перечня статистических алгоритмов, реализованных в качестве самостоятельных пакетов, в частности посвященных обработке MALDI-TOF масс-спектров, например, пакет MALDIquant [33].

Учитывая вышесказанное, разработка и внедрение комплексных схем индикации и идентификации микроорганизмов, основанных на использовании референсных спектров из баз данных и одновременном выявлении аналитически значимых биомаркеров конкретного патогена, позволит значительно расширить возможности практического использования технологии MALDI-TOF MS.

Одно из наиболее востребованных направлений протеомных исследований, получившее широкое развитие за последние десять лет, – изучение возможности применения MALDI-TOF MS для выявления возбудителей инфекционных болезней в клинических образцах без этапа выделения чистой культуры на стадии пробоподготовки. Однако отсутствие регламентированных методик обеззараживания и подготовки исследуемого нативного материала, а также доступного программного обеспечения для анализа образцов, является основной причиной относительно низкой воспроизводимости результатов масс-спектрометрии.

Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией, позволяющая анализировать качественный и количественный белковый состав микроорганизмов, представляет собой одну из эффективных технологий для разработки схем детекции микроорганизмов. Совершенствование и внедрение высокотехнологического оборудования способствовало увеличению разрешающей способности этого метода в области идентификации и дифференциации целого ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий [64].

Сложность детекции и типирования близкородственных патогенных бактерий обуславливает, прежде всего, сходство морфологических, биохимических характеристик, тинкториальных свойств, наличие родоспецифичных и перекрестно реагирующих антигенов. Реализация метода MALD-TOF MS для идентификации микроорганизмов различными приборами с оригинальным программным обеспечением, а также поставляемыми производителями коммерчески доступными базами референсных масс-спектров, позволяет за короткое время с высокой точностью идентифицировать возбудителей многих бактериальных инфекций.

На основании обзора российских и зарубежных публикаций за предыдущее десятилетие можно заключить, что метод MALDI-TOF MS успешно используется для индикации и идентификации высокопатогенных для человека бактерий: *Bacillus anthracis*, *Yersinia* spp., *Brucella* spp.

Krishnamurthy с соавт. [1996] одни из первых опубликовали сообщение об успешном использовании времяпролетной масс-спектрометрии для идентификации высокопатогенных для человека микроорганизмов *Yersinia pestis* [91]. Кроме того, при анализе полученных белковых профилей авторами были определены специфичные для этого возбудителя биомаркеры, подтверждение присутствия которых в последующих

работах отсутствует, очевидно, вследствие использования различных методик для пробоподготовки и обеззараживания бактериальных суспензий культур возбудителя чумы.

Позднее были проведены исследования по определению таксономической принадлежности методом времяпролетной масс-спектрометрии для 146 представителей рода *Yersinia* spp., опубликованные Р. Lasch с соавт. [93]. Для увеличения представительности используемой коллекции штаммов в нее были включены 13 видов иерсиний, в частности 21 штамм *Y. pestis*, и 35 штаммов из 10 различных родов семейства *Enterobacteriaceae*. На основании полученных белковых профилей штаммов была создана референсная база масс-спектров, выявлены два сигнала 4185 и 8370 Да, встречающиеся у всех представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Были установлены специфичные пики для представителей рода *Yersinia* spp., в частности, 4350, 5427, 6046 и 6241 Да, и определены уникальные специфичные для каждого вида сигналы: *Y. pestis* (3065 Да), *Y. enterocolitica* (7149, 7262, 7318, 9238, 9608 и 9651 Да), *Y. pseudotuberculosis* (6474 Да). Более углубленный анализ позволил установить, что биомаркер массой 3065 Да позволяет выявлять штаммы возбудителя чумы, содержащие плазмиду рРСР1. По мнению авторов, метод времяпролетной масс-спектрометрии, особенно в сочетании с различными биоинформационными подходами, позволяет эффективно проводить типирование представителей рода *Yersinia*. Использование авторами при интерпретации полученных данных кластерного анализа позволило подтвердить высокую степень соответствия таксономической принадлежности штаммов возбудителя чумы с классификацией на основании данных MALDI-TOF MS [93].

Параллельно для дифференциации непатогенных видов рода *Yersinia* от патогенных видов: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. Enterocolitica* S. Аyyadurai с соавт. применили собственную электронную базу масс-спектров различных представителей этого рода [43]. Сопоставление результатов масс-спектрометрического анализа клинических и природных изолятов этого патогена с данными базы позволили не только выявить уникальные белковые маркеры и провести с их помощью однозначную межвидовую дифференциацию для 39 штаммов *Y. pestis*, но и успешно определить их принадлежность к биотипам *Antiqua*, *Medievalis* и *Orientalis*. В данном исследовании на этапе обеззараживания бактериальной суспензии использовали раствор 70 % муравьиной кислоты, что, по мнению авторов, позволяло получить надлежащего качества белковые экстракты при полной инактивации образцов. Авторы отмечали, что экстракция белков раствором 80 % трифторуксусной

кислоты приводит к их частичной фрагментации, и, как следствие, отсутствию возможности получения интерпретируемых масс-спектров.

В последующие годы сложность получения однозначных результатов при межвидовой дифференциации представителей *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* методом MALDI-TOF MS определила необходимость использования дополнительных биоинформационных подходов для обработки и анализа полученных данных [162]. В данной работе было проведено типирование изолятов рода *Yersinia* spp., в том числе: 32 штаммов *Y. enterocolitica*, 18 – *Y. pseudotuberculosis* и 11 штаммов *Y. pestis*. Белковую экстракцию осуществляли раствором 80 % трифторуксусной кислоты. Сравнительный анализ полученных данных с референсными масс-спектрами коммерческой базы позволил провести однозначную идентификацию только для штаммов *Y. enterocolitica*. Достоверная дифференциация остальных штаммов *Yersinia* spp. была проведена с помощью обработки и интерпретации данных в среде языка статистического программирования «R». Кроме того, было подтверждено присутствие ранее выявленного видоспецифичного биомаркера с массой 3065 Да на всех полученных в данной работе масс-спектрах штаммов *Y. pestis* [93].

Эффективность проведения экстракции белков из бактериальных экстрактов культур возбудителя чумы в растворе 80 % трифторуксусной кислоты в сравнении с использованием смеси муравьиная кислота/этанол была подробно изучена в работе Drancourt [55]. В ходе проведенного исследования было экспериментально подтверждено, что осуществление экстракции белков в среде муравьиная кислота/этанол является наиболее оптимальным для последующего их анализа методом MALDI-TOF MS. На основе результатов времяпролетной масс-спектрометрии, а также данных методов «top-down»/«bottom-up» были выявлено 16 уникальных для штаммов возбудителя чумы биомаркеров, присутствующих на более чем 80 % исследованных спектров [96].

Результаты успешной идентификации штаммов *Y. pestis* до вида методом времяпролетной масс-спектрометрии описаны в работе А.Н. Спицына с соавтр. [27]. В работе использовали 25 изолятов *Y. pestis*, выделенных в период с 1970 по 2014 год в различных природных очагах чумы. Кислотную экстракцию проводили с использованием 96 % этанола и 70 % водного раствора муравьиной кислоты. В рамках исследования была создана и успешно апробирована электронная база референсных масс-спектров штаммов *Y. pestis*, позволяющая проводить идентификацию изолятов этого возбудителя. Кроме того, в ходе сравнительного анализа полученных данных были выявлены биомаркеры,

уникальные для основного подвида *pestis* (3061 Да) и общие для штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* (4830, 5426, 8366, 9658, 10297, 13268 Да).

Последующая работа Т.В. Каримовой [2017] продемонстрировала эффективность комплексного подхода при лабораторных исследованиях на энтеропатогенные иерсинии, который сочетал мультиплексную ПЦР и ускоренный вариант MALDI-TOF MS идентификации колоний бактериальных культур, что позволяло одновременно проводить детекцию и типирование *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в одной пробе [8]. Вместе с тем, анализ масс-спектров энтеропатогенных иерсиний из различных источников выделения позволил установить принадлежность изолятов к разным сероварам и биотипам.

На основании вышеизложенного можно заключить, что использование метода MALDI-TOF MS для анализа представителей рода *Yersinia* spp. позволяет проводить углубленную характеристику и идентификацию возбудителя чумы и остальных видов иерсиний. Однако сложность получения однозначных результатов при межвидовой дифференциации представителей *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* методом MALDI-TOF MS определяет необходимость разработки и внедрения дополнительных биоинформационных подходов для обработки и анализа полученных данных.

Результаты одного из первых исследований возбудителя сибирской язвы методом MALDI-TOF MS были опубликованы в конце прошлого столетия [91]. Инактивацию бактериальных суспензий культур *Bacillus anthracis* авторы проводили под воздействием  $\gamma$ -облучения. В результате сравнительного анализа полученных данных были установлены специфичные для возбудителя сибирской язвы сигналы (6679, 6835 и 7082 Да), два из которых (6679 и 6835 Да) были подтверждены в последующих независимых исследованиях Y. Nathout [78], V. Ryzhov [124], Y. Nathout и B. Setlow с соавторами [79].

Масс-спектрометрический анализ представителей нескольких видов рода *Bacillus* spp. провели Elhanany с соавтр. [2001], в ходе которого были выявлены биомаркеры, специфичные для споровой формы *B. anthracis*, а также отдельные фрагменты для каждого вида из группы *Bacillus cereus*: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* [66]. Было установлено, что использование кислот на этапе пробоподготовки и обеззараживания бактериальных суспензий приводит к эффективной экстракции малых кислоторастворимых белков SASP (Small Acid-Soluble Proteins). Подтверждено присутствие на масс-спектрах споровой формы штаммов возбудителя сибирской язвы ранее выявленных сигналов (6679, 6835 и 7082 Да), ассоциированных с

белками  $\beta$ -SASP,  $\alpha$ -SASP and  $\alpha/\beta$ -SASP, которые, по мнению авторов, могут быть потенциальными биомаркерами при индикации представителей группы *Bacillus cereus* [79].

Совместное применение MALDI-TOF MS в сочетании с тандемной масс-спектрометрией и технологией электроспрея ESI (англ. electrospray ionization) позволило обнаружить диапазон изменения массы ранее описанного биомаркера для штаммов *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis* [50]. Так, фрагмент, соответствующий малому кислоторастворимому белку  $\beta$ -SASP для штаммов *B. anthracis* имеет массу 6679 Да, а на масс-спектрах штаммов *B. cereus* и *B. thuringiensis* регистрируется в диапазоне масс 6695 и 6711 соответственно.

Позднее Р. Lasch с соавт. [2009] провели масс-спектрометрический анализ 374 штаммов разных видов *Bacillus* spp., в том числе, 102 штамма *B. anthracis*, инактивацию бактериальных экстрактов осуществляли в растворе 80 % трифторуксусной кислоты [94]. Интерпретацию полученных данных проводили с использованием математических моделей: иерархического кластерного анализа и искусственных нейронных сетей. Авторами были определены фрагменты, уникальные для различных таксономических подгрупп представителей *Bacillus* spp., в частности, для *B. cereus* было обнаружены биомаркеры, присутствующие более чем на 80 % полученных масс-спектров (5171, 5886 и 7368 Да), для *B. anthracis* – 4606, 5413 и 6679 Да. В последующих работах было установлено, что описанный ранее специфичный для *B. anthracis* (6679 Да), соответствующий кислоторастворимому белку  $\beta$ -SASP сигнал, присутствовал также на масс-спектрах *B. cereus* [49, 65]. Совокупность из 23 специфичных для представителей *B. anthracis* биомаркеров, воспроизводимость которых была подтверждена более чем для 60 % исследованных масс-спектров, представлена в работе Р. Lasch с соавтр. [96]. Различия могут быть связаны с существованием атипичных штаммов, отличающихся по ряду фенотипических и генетических свойств, к которым можно отнести аттенуированные вакцинные штаммы [6].

В более поздних работах на этапе экстракции белков из бактериальных суспензий спор возбудителя сибирской язвы ряд исследователей апробировали использование смеси муравьиная кислота/этанол [65]. Для обнаружения спор методом MALDI-TOF MS в подозрительных порошках использовали экстракцию белков непосредственно из образцов материала, минуя стадию получения вегетативной культуры, необходимой для

идентификации с коммерческими платформами типа BioTyper (Bruker Daltonics). Альтернативой был новый алгоритм классификации, реализуемый при обработке данных с пакетом программ Matlab R2012b (MathWorks, Natick, MA) и Bioinformatics toolbox (version 3.0). Этот подход обеспечил прямое обнаружение  $2,5 \times 10^6$  м.к./мл спор сибиреязвенного микроба в подозрительных порошках разного происхождения.

Таким образом, быстрое обнаружение возбудителя сибирской язвы в объектах окружающей среды особенно важно в ситуации, характерной для вспышки инфекции, предположительно вызванной преднамеренным использованием спор *B. anthracis* в качестве средства биологического оружия или биотерроризма. Индикация спор непосредственно в образцах методом MALDI-TOF MS позволила бы значительно сократить объем исследований и сделать их более целенаправленными. Вместе с тем, актуальна потребность в разработке и применении для интерпретации MS данных эффективного биоинформационного подхода, которая обусловлена неоднозначностью сведений о характеристиках масс-спектров вегетативных и споровых клеток сибиреязвенного микроба, что представляется актуальным, особенно при исследовании образцов, содержащих споры.

Таким образом, метод MALDI-TOF MS применяется в целях детекции возбудителей инфекционных болезней, в том числе особо опасных, в клинических, контаминированных образцах, а также пробах из окружающей среды с использованием референсных спектров из локальных и коммерческих баз данных. Представленные в литературе данные позволяют говорить о результатах индикации и идентификации на основании белкового профилирования таких высокопатогенных для человека бактерий как: *Brucella* spp., *Bacillus anthracis*, *Burkholderia* spp., *Yersinia* spp., *Vibrio* spp., *Francisella* spp. Вместе с тем, имеются сведения о выявленных на MALDI-TOF масс-спектрах для каждого патогена групп высокоспецифичных фрагментов – белковых биомаркеров. В настоящее время это направление находится в активной фазе развития.

В то же время, применение этого метода для типирования широкого круга бактериальных патогенов позволило выявить трудности не только при определении на уровне близкородственных видов (например, *B. ceti* и *B. pinnipedialis*), но и при внутривидовой систематизации (например, серотипы *Escherichia coli*, 1 и 4 биовары *Brucella suis*) [53, 75, 103].

Кроме того, в виду сложности проведения однозначной межвидовой дифференциации, в частности представителей *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*, разработка новых биоинформационных подходов для интерпретации полученных данных, очевидно, будет способствовать увеличению дискриминирующей способности времяпролетной масс-спектрометрии.

#### **1.4.2 Использование MALDI-TOF MS для характеристики микроорганизмов рода *Brucella* spp.**

Традиционно определение видов микроорганизмов *Brucella* spp. проводят по комплексу культурально-морфологических и биохимических свойств штаммов возбудителя. Выявление фенотипических особенностей культур бруцелл, характеризующихся сходством морфологических, биохимических, серологических свойств продолжительно по времени и требует специальных навыков и опыта. В свою очередь, развитие информационных технологий и методов молекулярно-генетической характеристики возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе и возбудителя бруцеллеза, позволяет решать фундаментальные и практические задачи микробиологии, эпидемиологии.

В последние годы при дифференциации клинически значимых видов патогенных микроорганизмов помимо существующих подходов, в качестве надежной и быстрой альтернативы используются масс-спектрометрические методы исследования. В частности, метод MALDI-TOF MS, успешно применяемый при дифференциации бактерий рода *Brucella*, позволяет проводить типирование на уровне видов, основываясь на анализе белковых профилей. К основным задачам белкового профилирования можно отнести не только качественное определение экспрессии генов на протеомном уровне, но и мониторинг частоты встречаемости экспрессируемых белков на уровне рода и вида микроорганизма. Кроме того, такие ключевые параметры времяпролетной масс-спектрометрии как чувствительность и специфичность, определяют ее потенциал для прямого анализа возбудителя бруцеллеза в рутинной клинической практике.

Одна из первых работ, посвященных анализу штаммов *B. melitensis*, *B. suis* и *B. abortus* методом MALDI-TOF MS была опубликована в 1996 г. Т. Krishnamurthy с соавт. [91].



Последующее всестороннее изучение методом времяпролетной масс-спектрометрией культур этого возбудителя предпринял L. Ferreira в 2010 г. [71]. Была апробирована методика подготовки проб для масс-спектрометрического анализа, включающая этапы инактивации и последующей экстракции белковых фракций из клеточных культур возбудителя бруцеллеза с использованием этилового спирта и раствора 70 % муравьиной кислоты. По мнению авторов, применение в качестве обеззараживающего агента этанола с последующей кислотной экстракцией оказывало минимальное разрушающее воздействие на структуру белков, что обуславливало оптимальное качество получаемых масс-спектров. Авторы впервые получили с использованием коммерческой платформы MALDI Biotyper референсные масс-спектры для культур бруцелл: *B. melitensis* (для штаммов 1, 2 и 3 биоваров), *B. abortus* (биовары 1, 2, 5 и 9), *B. suis*, *B. canis*, *B. ceti* и *B. pinnipedialis*. Для оценки возможности выявления бруцелл непосредственно из клинического материала в работе использовали искусственно полученные пробы крови, характеризовавшиеся положительным ростом культуры возбудителя бруцеллеза. Кроме того, на основе сравнительного анализа полученных данных было установлено присутствие на масс-спектрах общих для всех штаммов бруцелл сигналов: 2426, 2585, 3757, 4851, 5168, 5870, 6282, 6672, 7042, 7393 и 7511 Да. Для представителей *B. melitensis* определили следующие пики: 4244, 4286 и 6854 Да, для штаммов *B. abortus* – 3899, 6166 и 7358 Да. Идентификация культур *Brucella* spp., а также проб крови, характеризовавшихся положительным ростом культуры возбудителя бруцеллеза, с использованием MALDI Biotyper, по мнению авторов, была достоверной только до рода. При типировании бруцелл получены неоднозначные результаты, например, копии одного и того же белкового экстракта в ряде случаев программа идентифицировала как разные виды. Некорректность результатов при видовой дифференциации бруцелл с использованием ПО MALDI Biotyper, очевидно, может быть обусловлена недостаточной представительностью библиотеки референсных масс-спектров для возбудителя бруцеллеза, используемой в данном исследовании. Вместе с тем, для получения наилучших результатов необходимо использовать стандартные условия культивирования (среда, фаза роста, температура), идентичные тем, что были использованы для культивирования образцов, при создании референсных единиц базы данных.

На основании анализа результатов исследования L. Ferreira, становится очевидным, что MALDI-TOF MS позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ

белковой фракции бактериальной клетки с возможностью выявления групп рибосомных белков, присутствующих в клетке в достаточном количестве и являющихся консервативными в пределах вида микроорганизма, а точность микробиологической идентификации зависит от количества исследуемого материала [63, 123].

Кроме того, получение специфичных для *Brucella spp.* масс-спектров экстрактов белков обуславливает эффективность использования времяпролетной масс-спектрометрии для быстрой идентификации возбудителя бруцеллеза. В качестве значительного преимущества метода можно рассматривать возможность выявления на белковых профилях высокоспецифичных фрагментов, комплексный анализ которых, очевидно, позволит проводить идентификацию и типирование отдельных штаммов возбудителя бруцеллеза в экстрактах культур, в том числе содержащих смесь фрагментов разных микроорганизмов или иных контаминантов.

Уточнение таксономической принадлежности для различных изолятов *Brucella spp.* с использованием белкового профилирования представлено в исследовании F. Lista и A. Raaijw [98]. Идентификацию 152 клинических изолятов возбудителя бруцеллеза проводили с помощью электронной базы MALDI Biotyper, содержащей референсные масс-спектры штаммов бруцелл, относящихся к 18 различным генотипам. По данным авторов, точность видовой идентификации для изолятов возбудителя бруцеллеза составляла 98 % (149 штаммов), также была правильно определена принадлежность бруцелл *B. suis* к 1 и 2 биовару.

Последующее полномасштабное исследование эффективности использования MALDI-TOF MS в вопросах идентификации и дифференциации бруцелл описано в работе A. Karger с соавт. в 2013 г. [86]. В масс-спектрометрическом анализе были использованы представители всех установленных на тот момент видов и биоваров микроорганизмов *Brucella spp.*, в том числе, 104 полевых изолята, в качестве контроля – 33 референсных и вакцинных штаммов возбудителя бруцеллеза. Протокол пробоподготовки включал этапы экстракции белковых фракций из клеточных культур возбудителя бруцеллеза с использованием этилового спирта и раствора 70 % муравьиной кислоты. Точность видовой идентификации бруцелл с помощью электронной базы MALDI Biotyper составляла 92 %, кроме того были правильно определены биовары для *B. suis*.

Другой группой исследователей были проанализированы евклидовы расстояния между видами и биоварами изолятов *Brucella spp.* при 3D моделировании на основе MSP

спектров (от англ. «main spectrum») в программе MALDI Biotyper и в среде языка статистического программирования «R», по результатам которого были установлены несоответствия между полученными результатами и классической таксономией, основанной на фенотипических признаках [86]. Авторами при дифференциации белковых профилей штаммов 3 и 4 биоваров было предложено использовать статистическое моделирование на основе метода главных компонент. Вместе с тем, полученные сходные спектры для штаммов *B. abortus* и *B. melitensis*, по их мнению, также затруднили однозначную дискриминацию представителей этих видов. Учитывая ошибочные результаты идентификации видов и биоваров бруцелл при анализе с помощью MALDI Biotyper, автором было предложено статистическое моделирование на основе коммерческого ПО ClinProTools (Bruker Daltonics, Германия). В качестве основных ограничений для эксплуатации этого подхода выступают относительно высокая стоимость ПО и расходных материалов, необходимость стандартизации условий культивирования штаммов бруцелл и протоколов пробоподготовки.

Экспериментальные исследования по оценке специфической стерильности бактериальных экстрактов бруцелл с использованием нового протокола обеззараживания были проведены J. Mesureur [104]. В качестве инактивирующего агента при работе с культурами *B. papionis*, *B. melitensis* и *B. inopinata* использовали смесь, включающую 33 % ацетонитрила, 33 % этанола, 3 % трифторуксусной кислоты и 31 % воды. Предложенное соотношение компонентов, по мнению авторов, приводило к полному обеззараживанию клеток патогена с сохранением необходимого качества полученных масс-спектрометрических данных. Все полученные белковые профили, представленные авторами в работе, содержали от 100 до 300 сигналов. Воспроизводимость на всех масс-спектрах 13 сигналов, общих для всех штаммов возбудителя бруцеллеза, разрешение для которых превышало 500 единиц, позволило авторам правильно идентифицировать все протестированные в ходе данного исследования штаммы возбудителя бруцеллеза. Таким образом, было экспериментально подтверждено, что для масс-спектров экстрактов белковых профилей бруцелл в диапазоне 2000-20000 Да характерна высокая воспроизводимость и специфичность, позволяющая проводить видовую дифференциацию возбудителя бруцеллеза.

Опыт использования различных вариантов методик подготовки проб в рамках проведения масс-спектрометрического анализа бруцелл подтверждает предположение о

том, что проведение лизиса клеток большинства бактериальных патогенов в среде подкисленного органического растворителя на этапе пробоподготовки благоприятствует экстракции именно пула основных рибосомных белков, обладающих относительно небольшой молекулярной массой. Это, в свою очередь, обуславливает легкость их перевода при облучении в ионизированное состояние практически без фрагментации, что делает оптимальным их использование в качестве надежных биомаркеров для рутинной идентификации возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF MS [140]. Поскольку бруцеллы являются не спорообразующими микроорганизмами I-II групп патогенности, для этапа экстракции бактериальных основных белков этого возбудителя, наилучшим образом подходит смесь ацетонитрила и муравьиной кислоты после предварительной обработки раствором 70 % этанола. Эффективность данного подхода определяется возможностью образования достаточного количества изолированных спектральных пиков на масс-спектрах при низкой интенсивности шумовых сигналов [56, 76, 103, 127].

Несомненно, получение специфичных масс-спектров культур возбудителя бруцеллеза дает основание для эффективного применения MALDI-TOF MS в целях быстрой идентификации и типирования патогена. Однако, вследствие того, что бруцеллы характеризуются относительно медленным ростом при культивировании на питательных средах, рекомендовано использовать селективные питательные среды, обеспечивающие ингибирование или уменьшение числа колоний остальных микроорганизмов, особенно в загрязненных образцах или в образцах, содержащих очень небольшое число жизнеспособных штаммов возбудителя бруцеллеза. Важный вопрос при исследовании бруцелл методом MALDI-TOF масс-спектрометрии – зависимость результатов идентификации от условий культивирования штаммов возбудителя бруцеллеза, таких как качество питательной среды, время роста и др. Так, ряд научных публикаций сообщает о существенном влиянии времени инкубации микроорганизма на характеристики полученных масс-спектров [122].

Известно, что большинство рибосомных белков, соответствующих отдельным сигналам на масс-спектрах, относится к умеренно основным ввиду наличия в структуре преимущественно остатков лизина и аргинина, что обуславливает значение изоэлектрической точки (pI) в среднем равной 10. Указанные белки обладают средней гидрофобностью, кодируются более чем 50 генами, рассеянными в основном в хромосомных локусах [56]. Рибосомные белки большей частью представлены наиболее

распространенными цитозольными белками, количество которых в клетках микроорганизма не зависит от стадии жизнедеятельности или условий роста. Диапазон масс для данной группы белков варьирует в пределах от 2 до 20 кДа, который, собственно, и исследуется методом MALDI-TOF MS [88].

Первая наиболее полная характеристика специфичных для бруцелл биомаркеров представлена в 2016 г. работе P. Lasch с соавт. [83, 96]. На основе результатов MALDI-TOF MS, а также данных методов «top-down»/«bottom-up» было охарактеризовано 26 специфичных для представителей *B. abortus* биомаркеров в диапазоне масс 3-11 кДа, воспроизводимость которых была подтверждена более чем для 80 % исследованных масс-спектров. Среди указанных для бруцелл биомаркеров 7 были идентифицированы как рибосомные 50S и 30S белки: L36 (4852 Да), L30 (7042 Да), L29 (7513 Да), L19 (8040 Да), S21 (8818 Да), S20 (9539 Да) и S15 (10080 Да). Биомаркеры с массой 3025; 3265; 3335; 4896; 5170; 5873; 6533; 6670 и 9790 Да не были охарактеризованы. Также были определены два белка 3698 и 7394 Да с доменом холодового шока ДХШ (от англ. *Cold-shock DNA-binding domain*), конфигурация которых позволяет связывать нуклеиновые кислоты. Структура белков-ДХШ бруцелл подобна белкам холодового шока для большинства бактерий и их функции определяют множество процессов, которые связаны с посттранскрипционной регуляцией генов [2]. Было идентифицировано два ДНК-связывающих гистоноподобных белка (от англ. *Histone-like bacterial DNA-binding protein*) с молекулярной массой 4538 и 9075 Да. Белки из этой группы присутствуют у всех прокариот, основной их функцией является поддержание компактности упаковки геномной ДНК [1]. Остальные три биомаркера с молекулярной массой 6281, 7660 и 9470 Да представляли собой: белок цитоплазматической мембраны YajC, C-субъединицы компонента F<sub>0</sub> АТФ-синтазного комплекса F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, и белок, участвующий в синтезе Молибден-кофакторов. Представленные авторами характеристики белков бруцелл, присутствие которых было подтверждено также и масс-спектрометрическими исследованиями, позволяет говорить о возможности их использования как специфичных биомаркеров возбудителя бруцеллеза. Следовательно, биомаркеры, выделенные от целых нефракционированных клеток бактерий, представляют собой интактные белки с молекулярной массой в диапазоне 2000-20000 Да, которые в виду биохимического состава подходят наилучшим образом для исследования методом MALDI-TOF MS [34, 69, 138, 141].

Проведение точной идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF MS с использованием коммерческого ПО, невозможно без применения представительной базы масс-спектров белковых экстрактов бруцелл высокого качества. В настоящее время во всем мире используются следующие коммерческие MALDI-TOF системы: MALDI Biotyper DB v 3.1 (Bruker Daltonics, Германия), Saramis (AnagnosTec, Германия), Andromas (Andromas, Франция) и Vitek MS (bioMérieux, Франция).

В связи с тем, что, коммерчески доступные базы данных, используемые на территории Российской Федерации, практически не содержат информацию о возбудителе бруцеллеза, актуальной задачей является разработка пополняемой базы данных референсных масс-спектров белковых экстрактов культур микроорганизмов рода *Brucella*.

В настоящее время в нашей стране ведется подготовка нормативно-методической базы по применению метода MALDI-TOF MS. С 2011 г. масс-спектрометрия была внесена в реестр медицинских технологий, масс-спектрометры вошли в государственный реестр изделий медицинской техники (сертификаты Госстандарта России об утверждении средств измерений), который находится в общем доступе по адресу: <https://all-pribors.ru/search?text=maldi-tof>. Кроме того, разработаны и внедрены в практику отечественные базы данных белковых профилей возбудителей особо опасных инфекций, в том числе бруцелл. При совместном участии специалистов учреждений Роспотребнадзора создана электронная база данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper» (свидетельство о государственной регистрации базы данных в Реестре баз данных № 2016620345 от 15 марта 2016 г.), предназначенная для систематизации, анализа и хранения информации о белковых профилях микроорганизмов I-II групп патогенности. База данных позволяет проводить идентификацию и филогенетическую классификацию отдельных видов бактерий возбудителей ООИ, в том числе бруцелл, и может быть интегрирована в программу MALDI Biotyper DB v 3.1 (Bruker Daltonics, Германия).

За предыдущее десятилетие проведена активная разработка методов, обеспечивающих проведение прямого выявления возбудителей особо опасных бактериальных инфекций в пробах клинического материала. В зарубежных источниках литературы встречаются сообщения о возможности использования крови и цереброспинальной жидкости в протеомном профилировании для диагностики инфекционных болезней [40]. При этом прямая идентификация бактерий методом MALDI-

TOF MS с помощью программного пакета BioTuner возможна только до рода, реже до вида [109]. Низкие значения SCORE (коэффициент совпадения полученного масс-спектра с референсным из базы данных) при анализе экстрактов контаминированных образцов, в том числе клинических, вероятно, обусловлены присутствием в исследуемом материале фракций основных небактериальных белков, существенно влияющих на качество масс-спектров. Таким образом, в настоящее время выявление возбудителя бруцеллеза в экстрактах клинических образцов биологических жидкостей методом MALDI-TOF MS с использованием программы BioTuner неэффективно.

В связи с этим, изучение возможности применения MALDI-TOF MS для выявления возбудителей инфекционных болезней, в том числе бруцелл, в клинических или иных контаминированных образцах без этапа выделения чистой культуры или увеличения бактериальной массы на стадии пробоподготовки является востребованным направлением протеомных исследований [71]. При этом следует отметить, что метод MALDI-TOF MS для исследования клинических образцов при диагностике бруцеллеза имеет ряд ограничений, которые связаны, в том числе, с низкой концентрацией возбудителя в материале [13, 153]. Сложность интерпретации полученных MALDI-TOF MS масс-спектров при анализе клинических образцов обусловлена существенной вариабельностью качественного и количественного состава белковых профилей аналитов, полученных от различных индивидуумов. В качестве эффективного решения указанной проблемы исследователями предложены различные способы предварительной подготовки проб: концентрирование, фракционирование, удаление мажорных фракций белков, селективное удаление небелковых примесей и др. [134].

### **1.5 Заключение по главе 1**

В настоящее время все большее распространение и признание среди методов выявления и определения видовой принадлежности бактериальных патогенов приобретает метод MALDI-TOF MS, отличающийся методической простотой и скоростью проведения. Критическим для корректной идентификации патогенов этим методом является наличие представительной базы референсных масс-спектров штаммов возбудителя, которые существуют для многих бактерий, но в случае с бруцеллами подобные базы в коммерческих программных продуктах отсутствуют. Другая сложность

идентификации бруцелл до вида методом времяпролетной масс-спектрометрии заключается в высоком сходстве белковых профилей отдельных видов. Несмотря на быстроту выполнения MALDI-TOF MS анализа, его постановка требует использования чистой культуры, время выделения которой для бруцелл может составлять несколько суток. До сих пор метод масс-спектрометрической детекции бруцелл непосредственно в исследуемом материале, в частности, в крови больных, не разработан, будучи весьма востребованным в лабораторной диагностике бруцеллеза.

Обзор литературных источников позволяет сделать вывод о том, что анализ бруцелл основных патогенных видов с использованием MALDI-TOF MS позволяет проводить выявление комплекса масс-спектрометрических биомаркеров, специфичных для микроорганизмов *Brucella* spp., определяющих возможность родовой и видовой дифференциации исследуемого возбудителя. Кроме того, определение основных закономерностей изменения параметров масс-спектров от выбора питательных сред, используемых при культивировании штаммов *Brucella* spp., является актуальным.

Перспективным направлением в данной области исследований представляется разработка схемы идентификации возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, включающей анализ родо-, видо- и штаммоспецифичных биомаркеров.

Практическую значимость имеет определение возможности применения времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией для специфической индикации *Brucella* spp. в экспериментах с модельными гемокультурами и клиническими образцами (кровь).



## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1 Объекты исследования

Объекты для исследования: бактериальные взвеси культур *Brucella* spp., искусственно контаминированные возбудителем бруцеллеза пробы крови от человека (модельные клинические образцы), кровь инфицированных в условиях эксперимента мышей, пробы клинического материала (кровь) от людей с острой формой заболевания.

##### 2.1.1 Штаммы микроорганизмов

Апробация масс-спектрометрического метода для определения родовой/видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза проведена на штаммах *Brucella* spp. Для исследования было использовано 96 штаммов бруцелл разных видов и биоваров: *Brucella abortus* – 26, *Brucella melitensis* – 24, *Brucella suis* – 26, *Brucella ovis* – 11, *Brucella canis* – 3, *Brucella neotomae* – 6 (Таблица 1).

Таблица 1 – Штаммы *Brucella* spp., использованные в работе

№	Штамм	Источник выделения	Дата выд-я	Биовар	Место выделения
1	2	3	4	5	6
1.	<i>B. abortus</i> 19 ВА	вакцинный	1923	-//-	-//-
2.	<i>B. abortus</i> 544 АТСС 23448	референсный	1966	1	Коллекция культур, Англия, Вейбридж
3.	<i>B. abortus</i> 1552	кровь больного	1962	5	Коллекция культур, Англия, Вейбридж
4.	<i>B. abortus</i> 870 АТСС 23453	референсный	1966	6	ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
5.	<i>B. abortus</i> С-68 АТСС 23455	референсный	1966	9	Коллекция культур, Англия, Вейбридж
6.	<i>B. abortus</i> 63/75 АТСС 23454	референсный	1966	7	ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
7.	<i>B. abortus</i> В-3196 АТСС 23452	референсный	1966	5	ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
8.	<i>B. abortus</i> Tulya АТСС 23450	референсный	1966	3	Коллекция культур, Англия, Вейбридж

№	Штамм	Источник выделения	Дата выд-я	Биовар	Место выделения
1	2	3	4	5	6
9.	<i>B. abortus</i> C-548	мышевидные грызуны Австралии	-/-	6	ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
10.	<i>B. abortus</i> C-549	мышевидные грызуны Австралии	-/-	6	ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
11.	<i>B. abortus</i> C-550	кровь человека	2012	3	Республика Калмыкия, Целинный район, п. Аршан
12.	<i>B. abortus</i> 19 S	молоко коровы	1967	1	США
13.	<i>B. abortus</i> C-497	кровь человека	2001	1	Ставропольский край, п. Поперечный, к/х «Надежда»
14.	<i>B. abortus</i> C-551	кровь человека	2012	3	Республика Калмыкия, Ики-Бурульский район, п. Оргакин
15.	<i>B. abortus</i> C-499	кровь человека	2002	3	Ставропольский край
16.	<i>B. abortus</i> 344	плод коровы	1971	1	Ставропольский край
17.	<i>B. abortus</i> 345	плод коровы	1971	1	Ставропольский край, краевая СЭС
18.	<i>B. abortus</i> 349	плод коровы	-/-	3	-/-
19.	<i>B. abortus</i> 377	плод коровы	1971	1	КЧАО, Прикубанский район
20.	<i>B. abortus</i> 381	плод коровы	1971	1	КЧАО, Зеленчукский район
21.	<i>B. abortus</i> 384	плод коровы	1971	3	Ставропольский край, Курсавский район
22.	<i>B. abortus</i> 390	плод коровы	1971	1	КЧАО, Малокарачаевский район, п. Хасаут
23.	<i>B. abortus</i> 401	плод коровы	1971	3	Ветлаборатория, Ставропольский край
24.	<i>B. abortus</i> 403	плод коровы	1971	3	Ставропольский край
25.	<i>B. abortus</i> 420	плод коровы	1972	6	Армянская ССР, Мартунинский район
26.	<i>B. melitensis</i> 16-М	референсный	1966	1	Коллекция культур, Англия, Вейбридж
27.	<i>B. melitensis</i> 63/9	референсный	1966	2	ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
28.	<i>B. melitensis</i> 548		1948	1	ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
29.	<i>B. melitensis</i> C-538	кровь больного	2012	3	Республика Дагестан, Шамильский район, с. Ассаб
30.	<i>B. melitensis</i> C-539	кровь больного	2012	3	Республика Дагестан, Шамильский район, с. Ассаб
31.	<i>B. melitensis</i> C-541	кровь больного	2012	3	Республика Дагестан, п. Манас

№	Штамм	Источник выделения	Дата выд-я	Биовар	Место выделения
1	2	3	4	5	6
32.	<i>B. melitensis</i> C-542	кровь больного	2012	3	Республика Дагестан, Гергебельский район, с. Гергебель
33.	<i>B. melitensis</i> C-543	кровь больного	2012	3	Республика Дагестан, Левашинский район, с. Арада-Чугли
34.	<i>B. melitensis</i> C-544	кровь больного	2012	3	Республика Дагестан, Левашинский район, с. Арада-Чугли
35.	<i>B. melitensis</i> C-546	кровь больного	2012	3	Республика Дагестан, г. Каспийск, Кирпичный поселок
36.	<i>B. melitensis</i> C-547	кровь больного	2012	3	Республика Дагестан, Карабудахкентский район, с. Карабудахкент
37.	<i>B. melitensis</i> C-551	кровь больного	2012	3	Республика Калмыкия
38.	<i>B. melitensis</i> C-553	кровь больного	2012	3	Республика Калмыкия, Черноземельский район, п. Комсомольский
39.	<i>B. melitensis</i> C-552	кровь больного	2012	3	Республика Калмыкия, Малодербетовский район, п. Малые Дербеты
40.	<i>B. melitensis</i> C-554	кровь больного	2012	3	Республика Дагестан, РЦИБ г. Махачкала, Тарумовский район, с. Новодмитриевка
41.	<i>B. melitensis</i> C-555	кровь больного	2012	3	Республика Дагестан, РЦИБ г. Махачкала, Шамильский район, с. Мочох
42.	<i>B. melitensis</i> C-556	кровь больного	2012	1	Республика Дагестан, РЦИБ г. Махачкала, Хунзахский район, с. Ората
43.	<i>B. melitensis</i> C-557	кровь больного	2012	3	Республика Дагестан, РЦИБ г. Махачкала, Хунзахский район, с. Ората
44.	<i>B. melitensis</i> C-558	кровь больного	2013	3	Республика Дагестан, РЦИБ г. Махачкала, Левашинский район, с. Уллуая
45.	<i>B. melitensis</i> C-559	кровь больного	2013	1	Республика Дагестан, РЦИБ г. Махачкала, Лакский район, с. Камахал
46.	<i>B. melitensis</i> C-560	кровь больного	2013	3	Республика Калмыкия, Лаганский район, п. Улан-Хол

№	Штамм	Источник выделения	Дата выд-я	Биовар	Место выделения
1	2	3	4	5	6
47.	<i>B. melitensis</i> C-561	кровь больного	2013	3	Республика Калмыкия, Ики-бурульский район, п. Южный
48.	<i>B. melitensis</i> C-562	кровь больного	2013	3	Республика Калмыкия, г. Элиста
49.	<i>B. melitensis</i> C-563	кровь больного	2014	3	Республика Калмыкия, Черноземельский район, п. Артезиан
50.	<i>B. melitensis</i> C-564	кровь больного	2014	3	Республика Калмыкия, Черноземельский район, п. Прикумский
51.	<i>B. melitensis</i> C-565	кровь больного	2014	3	Республика Калмыкия, Черноземельский район, п. Прикумский
52.	<i>B. melitensis</i> C-566	-//-	2014	3	Республика Калмыкия
53.	<i>B. melitensis</i> Rev-1	вакцинный	1955	1	ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
54.	<i>B. melitensis</i> Ether 706	референсный	1966	3	Коллекция культур, Англия, Вейбридж
55.	<i>B. suis</i> 40	референсный	1962	4	-//-
56.	<i>B. suis</i> 484	домовая мышь	1965	-//-	Чечено-Ингушская Автономная Советская Социалистическая Республика (Чечено-Ингушская АССР)
57.	<i>B. suis</i> 686	референсный	1966	3	ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
58.	<i>B. suis</i> Thomsen	референсный	1966	2	Коллекция культур, Англия, Вейбридж
59.	<i>B. suis</i> 2-1/20-2	-//-		4	США
60.	<i>B. suis</i> 61	вакцинный	-//-	-//-	-//-
61.	<i>B. suis</i> 68/86	паховый лимфоузел кошки	1987	-//-	Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока
62.	<i>B. suis</i> 323	селезенка дом. мыши	1967	атипичный	Коллекция культур, Англия, Вейбридж
63.	<i>B. suis</i> 324	домовая мышь	1967	атипичный	Херсонская область
64.	<i>B. suis</i> 510	-//-	1973	-//-	Чечено-Ингушская АССР
65.	<i>B. suis</i> 512	-//-	1974	-//-	Чечено-Ингушская АССР
66.	<i>B. suis</i> 513	12 домашних мышей	1975	-//-	Чечено-Ингушская АССР, Назрановский район

№	Штамм	Источник выделения	Дата выд-я	Биовар	Место выделения
1	2	3	4	5	6
67.	<i>B. suis</i> 517	10 домашних мышей	1975	-//-	Чечено-Ингушская АССР, Сунженский район
68.	<i>B. suis</i> 521	-//-	1978	-//-	Чечено-Ингушская АССР, район Малгобекский, с. Новый Редант
69.	<i>B. suis</i> 522	труп домашней мыши	1978	-//-	Чечено-Ингушская АССР, район Малгобекский, с. Новый Редант
70.	<i>B. suis</i> 523	-//-	1978	-//-	Чечено-Ингушская АССР, район Малгобекский, село Новый Редант
71.	<i>B. suis</i> 524	-//-	1978	-//-	Чечено-Ингушская АССР, Сунженский район
72.	<i>B. suis</i> 539	селезенка домашних мышей	1978	-//-	Чечено-Ингушская АССР, Назрановский район, с. Андырка
73.	<i>B. suis</i> 1330	референсный	1962	1	Коллекция культур Англии, Вейбридж
74.	<i>B. suis</i> И-72	кровь больного	1967	4	г. Магадан
75.	<i>B. suis</i> И-200	песец кисточный	1970	4	Таймырский национальный округ, Красноярский край, с. Волочанка
76.	<i>B. suis</i> И-299	собака	1968	4	Чукотский округ, г. Анадырь
77.	<i>B. suis</i> S-705	-//-	-//-	-//-	Португалия, Лиссабонский центр ветеринарии
78.	<i>B. suis</i> 68		1962	4	
79.	<i>B. canis</i> 6/66	-//-	-//-	-//-	Коллекция культур, Англия, Вейбридж
80.	<i>B. canis</i> 1066	собака	1968	1	США
81.	<i>B. canis</i> Н-966	собака	-//-	-//-	США
82.	<i>B. neotomae</i> 65/198	-//-	-//-	-//-	Коллекция культур, Англия, Вейбридж
83.	<i>B. neotomae</i> 65/196	-//-	-//-	-//-	Коллекция культур, Англия, Вейбридж
84.	<i>B. neotomae</i> 325	-//-	-//-	1	Ставропольский край, СЭС
85.	<i>B. neotomae</i> 66/2	-//-	1966	1	Ставропольский край, СЭС
86.	<i>B. neotomae</i> 5К33	-//-	1966	-//-	Коллекция культур, Англия, Вейбридж
87.	<i>B. ovis</i> 707	баран	1971	-//-	Ставропольская ветлаборатория, станция искусственного осеменения
88.	<i>B. ovis</i> 712	подопытные овцематки	1972	-//-	Ставропольский край, Ставропольский НИВС

№	Штамм	Источник выделения	Дата выд-я	Биовар	Место выделения
1	2	3	4	5	6
89.	<i>B. ovis</i> 722	баран	1966	-//-	Аргентина
90.	<i>B. ovis</i> С-440 (№ 6)	баран	1987	-//-	Ставропольский край, Ставропольский НИВС
91.	<i>B. ovis</i> 704	баран	1970	-//-	Нальчикская станция искусственного осеменения
92.	<i>B. ovis</i> 706	баран	1971	-//-	с/з «Ставрополец» Шпаковского района
93.	<i>B. ovis</i> 709	баран	1971	-//-	Ставропольский край, Черкесская станция искусственного осеменения
94.	<i>B. ovis</i> 711	баран	1971	-//-	с/з «Ставрополец» Шпаковского района
95.	<i>B. ovis</i> 713	баран	1971	-//-	с/з «Ставрополец» Шпаковского района
96.	<i>B. ovis</i> 718	баран	1973	-//-	Научно-исследовательская ветеринарная станция, Черкесск

Примечание: «-//-» - нет данных.

### 2.1.2 Питательные среды, условия культивирования

Культивирование и исследование бруцелл, проб клинического материала осуществляли в соответствии с действующими нормативно-методическими документами по организации и проведению лабораторной диагностики данного инфекционного заболевания. Исследование возбудителя бруцеллеза с помощью микробиологических, физико-химических методов проводили с использованием коммерческих реактивов в соответствии с инструкциями производителя.

Принимая во внимание, что возбудитель бруцеллеза относят к агентам II группы патогенности, работа с ним проводилась в боксе биологической безопасности класса III или II-B в соответствии действующими санитарными правилами СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и следующими нормативными документами: МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза»; МУК 4.2.3010-12 «Порядок организации и

проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней».

Оценку взаимосвязи свойств питательных сред, рекомендуемых для культивирования бруцелл, с основными характеристиками соответствующих белковых профилей микроорганизмов *Brucella* spp. проводили с использованием следующих питательных субстратов: агар Альбими (производитель – ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, показатели качества: рН 7,2 – 7,4, прочность 300 – 380 г по Валенту, содержание аминного азота 100 – 120 мг %); бруцеллагар (производитель – Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», показатели качества: рН 7,0 ± 0,2, прочность 310 - 390 г по Валенту, содержание аминного азота 120 – 130 мг %); эритрит-агар (производитель – Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген»», показатели качества: рН 7,0 – 7,4, прочность 310 – 390 г по Валенту, содержание аминного азота 90 – 100 мг %). Среды собственного производства изготовлены в лаборатории питательных сред для культивирования микроорганизмов 1-4 групп патогенности ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора в соответствии с действующей документацией.

### **2.1.3 Обеззараживание и белковая экстракция культур *Brucella* spp.**

Одну бактериологическую петлю 48-часовой культуры бруцеллезного микроба эмульгировали в 300 мкл ультрачистой воды. Приготовление микробных взвесей проводили по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-85-2018) ГИСК им. Л.А. Тарасевича 10 единиц.

Этапы обеззараживания и белковой экстракции культур *Brucella* spp. проводили согласно МР (учрежденческий уровень, 2014 г.) «Обеззараживание и подготовка проб культур возбудителя бруцеллеза при работе методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией», в соответствии с требованиями действующих санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности».

### Процесс обеззараживания

К бактериальной суспензии возбудителя бруцеллеза добавляли 900 мкл спирта этилового 96 % и перемешивали. Затем полученную смесь инкубировали при температуре 30 °С в течение 90 мин. После проведенной инактивации образцы суспензии центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин, супернатант отбирали. Для полного удаления спирта процедуру центрифугирования повторяли.

После обеззараживания часть осадка высевали на скошенный бруцеллагар, посеvy инкубировали в течение 7-ми дней при 37 °С. На время проверки специфической стерильности пробирки с исследуемым материалом хранили при минус 18-20 °С.

При отсутствии специфического роста в пробирках с бруцеллагаром исследуемый материал считали обеззараженным. После инактивации проб вышеописанным способом дальнейшие исследования проводили как с обеззараженным материалом.

### **2.1.4 Пробоподготовка и обеззараживание образцов крови, искусственно контаминированных бруцеллами**

Для оценки возможности индикации бруцелл в модельных клинических образцах крови условно здоровых людей использовали 26 культур возбудителя двух видов: *B. abortus* 19 ВА, *B. abortus* 544, *B. abortus* 1552, *B. abortus* 870, *B. abortus* С-68, *B. abortus* 63/75, *B. abortus* В-3196, *B. abortus* Tulya, *B. abortus* С-548, *B. abortus* С-549, *B. abortus* С-550, *B. abortus* 19 S, *B. abortus* С-497, *B. abortus* С-551, *B. abortus* С-499, *B. abortus* 381, *B. abortus* 385, *B. abortus* 390, *B. abortus* 401, *B. abortus* 403, *B. abortus* 420 и *B. melitensis* 16-М, *B. melitensis* 63/9, *B. melitensis* 548, *B. melitensis* С-554, *B. melitensis* Rev-1.

#### Приготовление модельных образцов крови

В ходе настоящего исследования использовали пробы крови 30 условно здоровых людей. Из каждой пробы параллельно готовили три образца в двух повторах: 1, 2 – искусственно контаминировали культурой *B. melitensis* или *B. abortus*, 3 – использовали для получения белковых профилей крови - отрицательный контроль.

Одну бактериологическую петлю 48 часовой культуры бруцелл эмульгировали в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида, затем по 1 мл приготовленной суспензии переносили в вакутейнеры со стабилизированной кровью объемом 3 мл, свободной от бруцеллезного инфекта. Искусственно контаминированные бруцеллами



образцы крови инкубировали 48 часов при 37 °С. Аликвоту полученной взвеси объемом 2 мл центрифугировали при 2000 об/мин в течение 2 мин, полученную надосадочную жидкость удаляли. В дальнейшей работе использовали осадок, содержащий форменные элементы крови. Для удаления (лизиса) эритроцитов осадок разбавляли деионизированной водой в 10 раз, инкубировали 10 мин. Центрифугировали 3 мин при 2000 об/мин, супернатант удаляли. Процедуру повторяли до полного удаления эритроцитов. Суспензию отмытых лейкоцитов переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл и центрифугировали при 15500 об/мин 10 мин, супернатант удаляли.

Обеззараживание образцов, содержащих возбудитель бруцеллеза, проводили раствором 70 % этилового спирта по методике, используемой при работе с культурами возбудителя бруцеллеза. Часть полученного осадка использовали для проверки на специфическую стерильность.

#### Приготовление образцов отрицательного контроля

В качестве дополнительного контроля в работе по MALDI-TOF масс-спектрометрическому профилированию за соблюдением одинаковых условий с модельными образцами пробы крови условно здоровых людей (не больных, не переболевших бруцеллезом и не вакцинированных против этой инфекции) объемом 4 мл инкубировали при 37 °С в течение 48 ч, после чего центрифугировали при 2000 об/мин 30 сек. Супернатант отбирали в пробирки типа Эппендорф и центрифугировали при 15500 об/мин 5 мин, затем осадок промывали деионизированной водой.

Полученные белковые экстракты использовали в качестве отрицательного контроля.

### **2.1.5 Пробоподготовка и обеззараживание проб крови биопробных животных, зараженных возбудителем бруцеллеза**

Диагностическую информативность метода MALDI-TOF MS для прямого выявления белковых маркеров бруцелл в биоматериале исследовали при экспериментальном моделировании инфекции на мышах. В качестве биологических моделей были использованы белые беспородные мыши обоего пола массой от 18 до 22 г. В ходе эксперимента были сформированы четыре группы животных: 1 – заражали штаммом *B. melitensis* 548, 2 – *B. abortus* 544, 3 – *B. suis* 1330, 4 – группа сравнения (животные, кровь которых была использована в анализе в качестве отрицательного

контроля). При заражении мышам вводили подкожно в паховую область 0,5 мл суспензии соответствующего штамма в концентрации  $1 \times 10^5$  м.к./мл в растворе 0,9 % хлорида натрия, рН 7,2. Наблюдение за животными проводили в течение 21 суток.

Биопробных животных умерщвляли гуманным способом с помощью паров хлороформа. При работе с животными следовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123, г. Страсбург, 18.03.1986). У хлороформированных биомоделей отбирали кровь из сердца в объеме 2 мл. От зараженных животных производили посев паренхиматозных органов и лимфоузлов на агар Альбими, скошенный в пробирках. Посевы помещали в термостат при температуре  $(37 \pm 1)$  °С. Наблюдение за посевами проводили 14 суток, в течение которых был выявлен специфический рост бруцелл.

Принимая во внимание внутриклеточную локализацию возбудителя бруцеллеза, в качестве образца для белкового профилирования брали экстракт лейкоцитарной фракции крови. Для чего осадок, содержащий форменные элементы крови, разбавляли многократно дистиллированной водой с последующей инкубацией (10 мин) и центрифугированием до полного удаления эритроцитов. Освобождение от эритроцитов проводили до полного обесцвечивания получаемого в ходе промывки супернатанта. Суспензию отмытых лейкоцитов переносили в чистые микроцентрифужные пробирки и центрифугировали с удалением супернатанта при 15500 об/мин 10 мин.

Обеззараживание образцов лейкоцитарной фракции выполняли 70 % этиловым спиртом по методике, используемой при работе с культурами возбудителя бруцеллеза.

После обеззараживания часть осадка высевали на скошенный бруцеллагар, посевы инкубировали в течение 7-ми дней при 37 °С. Во время проведения контроля на специфическую стерильность образцы белковых экстрактов хранились при температуре минус 18 – 20 °С. При отсутствии специфического роста в пробирках с бруцеллагаром, исследуемый материал считали обеззараженным.

### **2.1.6 Пробоподготовка и обеззараживание клинического материала**

При исследовании клинического материала использовали стабилизированную гепарином венозную кровь от 52 условно здоровых и 19 больных людей с диагнозом острый бруцеллез, поступивших в «Инфекционное отделение, специализированное по

диагностике, лечению и профпатологии бруцеллёза» ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2» г. Ставрополя. Кровь отбирали в емкости для взятия венозной крови Vacutainer (Becton Dickinson International, США).

Стабилизированную кровь объемом 2 мл центрифугировали в течение 2 мин при 2000 об/мин, полученную надосадочную жидкость удаляли. В дальнейшей работе использовали осадок, содержащий форменные элементы крови.

Для лизиса эритроцитов осадок разбавляли дистиллированной водой в 10 раз, инкубировали 10 мин и центрифугировали 3 мин при 2000 об/мин, супернатант удаляли. Процедуру повторяли до полного удаления эритроцитов. Суспензию отмытых лейкоцитов переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5-2 мл и центрифугировали при 15500 об/мин 10 мин, супернатант удаляли.

Полученный осадок обеззараживали в соответствии с МР «Обеззараживание и подготовка проб культур возбудителя бруцеллеза при работе методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией», согласно которым, полученный осадок ресуспендировали в 300 мкл ДВ и добавляли 900 мкл спирта этилового 96 %, перемешивали, полученную смесь инкубировали при температуре 30 °С в течение 90 мин. После проведенной инактивации образцы суспензии центрифугировали в течение 10 мин при 12000 об/мин, супернатант удаляли. Для полного удаления спирта процедуру центрифугирования повторяли. После инактивации проб вышеописанным способом дальнейшие исследования проводили как с обеззараженным материалом.

На время проведения теста на специфическую стерильность пробирки с исследуемым материалом хранили при минус 18-20 °С.

### **2.1.7 Подготовка и анализ белковых экстрактов методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией**

Инактивированный осадок (для всех экспериментов) ресуспендировали в 100 мкл кислоты муравьиной 70 %. К смеси добавляли 100 мкл ацетонитрила и осторожно перемешивали. Нерастворимый остаток осаждали центрифугированием в течение 4 мин при 12 000 об/мин при температуре 10 °С. Полученные белковые экстракты использовали для масс-спектрометрического анализа.

Обеззараженный образец объемом 1 мкл помещали на пластину-мишень MS 96 spot Micro SCOUT Plate (Bruker Daltonics, Германия) из нержавеющей стали и высушивали на воздухе. Затем на высушенный образец наносили 1 мкл матрицы, состоящей из  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты в растворе, содержащем 500 мкл ацетонитрила, 475 мкл ультрачистой воды и 25 мкл трифторуксусной кислоты, и сушили на воздухе. Таким образом, достигалась гомогенность полученных образцов, что обеспечивало высокую воспроизводимость ( $> 95\%$ ) при получении масс-спектров в автоматическом режиме.

Готовую мишень использовали для анализа методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией в соответствии с рекомендациями компании-производителя масс-спектрометра.

Масс-спектры получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия) при следующих параметрах: частота лазера 60 Гц, интенсивность лазера 10–50 %, время задержки экстракции 110 нс P1E, напряжение первого источника ионов 19,4 kV, второго – 17,3 kV, напряжение фокусирующей линзы 8 kV, напряжение линейного детектора 2,500 kV, диапазон масс 2000–20000 Да.

Для управления масс-спектрометром, включая установку режимов работы и регистрации масс-спектров, использовали программный пакет Daltonics flexControl v.3.3.64 (Bruker Daltonics, Германия), для предварительной оценки интенсивности и разрешения пиков в спектре – flexAnalysis v 3.3.65.

Внутреннюю калибровку ранее указанного диапазона проводили с использованием точных значений масс бактериального тест-стандарта MBT (Bruker Daltonics, Германия). Каждый масс-спектр генерировали из 500 лазерных выстрелов (10×50 лазерных выстрелов с разных позиций каждой капли мишени).

Воспроизводимость белковых профилей исследованных образцов была подтверждена серией повторных измерений (не менее 4 повторов). При проведении масс-спектрометрического анализа проб, хранившихся не менее 3 суток при температуре минус 18 – 20 °С, изменений основных характеристик сигналов масс-спектров не выявлено.

Размер выборки  $n$ , необходимой и достаточной для получения достоверных значений рассчитывали по формуле

$$n = \frac{t^2 \delta^2}{\Delta^2}, \quad (1)$$

где  $t$  – нормированное отклонение;

$\delta$  – среднее квадратичное отклонение;

$\Delta$  – желаемая точность.

*Статистический анализ и визуализацию* полученных данных осуществляли с помощью пакетов «MALDIquant», «MALDIquantForeign», «sda» (URL: <http://strimmerlab.org/software/malDIquant/>) языка программирования «R» (URL: <https://cran.r-project.org/>) и «Mass-Up» (URL: <http://sing.ei.uvigo.es>). Обработку результатов масс-спектрометрического исследования, в частности детекцию и выравнивание сигналов, осуществляли средствами программного пакета «MALDIquant», реализованного в среде языка программирования «R».

Полученные в ходе работы масс-спектры для каждого анализируемого образца использовали для построения дендрограммы средствами программного пакета «MALDIquant», реализованного в среде «R», представляющего альтернативу для интерпретации данных MALDI-TOF MS. Представление полученных масс-спектров в виде иерархической структуры позволило определить положение каждого отдельного спектра на основании величины сходства характеристик его пиков со средними значениями характеристик в группе спектров. Результативность кластерного анализа определяли с использованием метрики дистанций  $d(x, y)$ , из предположения, что расстояние между объектами одной группы в целом меньше « $\epsilon$ », а между объектами из разных групп больше « $\epsilon$ », где « $\epsilon$ »  $> 0$  – задаваемый уровень сходства.

Построение собственного дерева для каждой повторной выборки с вычислением частоты встречаемости всех фрагментов в сформированной последовательности производили с использованием бутстреп-вероятности BP. Гипотезу о существовании кластера считали достоверной, если с ветвями бутстрепного дерева связывалась вероятность, превышающая 70 %. Построение дендрограммы проводили в евклидовом пространстве на основании данных матрицы признаков «featureMatrix».

В качестве метода для создания классификаций масс-спектров использовали анализ главных компонент (англ. principal component analysis, PCA), основное преимущество которого заключается в том, что из совокупности характеристик объекта наблюдения (в данном случае – масс-спектр образца) выбирают наиболее переменные величины (с точки зрения исследователя), значения которых откладывают по осям трехмерной системы

координат (главные компоненты) и на пересечении перпендикуляров из этих осей ставят точку. Используемое программное обеспечение позволило представлять проекции PCA-кластеризации в трехмерном пространстве.

На основании данных кластерного анализа проводили выявление групп образцов, схожих по масс-спектрометрическим профилям.

Интенсивность пиков корректировали с использованием фильтра sqrt (square root transformation, метод квадратного корня дисперсии), применение которого не влечет «завышения» базовой линии. Для сглаживания максимумов локальных пиков на спектрах и снижения уровня шума без значительных искажений в площадях пиков использовали метод Савицкого-Голея [129]. Устранение фоновых шумов базовой линии проводили с использованием алгоритма SNIP (Non-linear Iterative Peak-clipping algorithm), который позволяет сохранить максимумы интенсивности целевых пиков. При выравнивании значения  $m/Z$  для гомологичных сигналов на разных спектрах удаляли пики, частота встречаемости которых составляла менее 25 %.

В качестве маркеров использовали сигналы,  $p$ -значение которых было меньше 0,05 (URL: <https://www.sing-group.org/mass-up/manual>). Частоту встречаемости каждого потенциального маркера рассчитывали с использованием пакета прикладных программ Statistica v 10.0 (Statsoft Inc., США). Расчет диагностической эффективности маркеров проводили на основании анализа ROC-кривой (Area Under Curve).

Для установленных маркеров рассчитывали следующие критерии: точность, чувствительность, специфичность и прогностическая ценность положительного диагноза (PPV). Расчет проводился с использованием специализированного электронного ресурса (URL: [https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)).

Расчет Чувствительности, т.е. доли истинно положительных результатов среди всех проведенных тестов, проводили по формуле

$$\text{Чувствительность} = \frac{a}{a+b} \times 100 \%, \quad (2)$$

где  $a$  – количество истинно больных;

$b$  – количество ложно здоровых.

Расчет Специфичности, т.е. доли истинно отрицательных результатов среди здоровых лиц в группе исследуемых, проводили по формуле

$$\text{Специфичность} = \frac{d}{c+d} \times 100 \%, \quad (3)$$

где  $c$  – количество ложно больных;

$d$  – количество истинно здоровых.

Расчет Точности, т.е. доли правильных результатов теста среди всех обследованных пациентов, проводили по формуле

$$\text{Точность} = \frac{a+d}{(a+b+c+d)} \times 100 \% \quad (4)$$

Расчет прогностической ценности положительного диагноза, определяющей вероятность наличия заболевания при положительном тесте, проводили по формуле

$$PPV = \frac{\text{Чувствительность} * \text{Распространенность}}{\text{Чувствительность} * \text{Распространенность} + (1 - \text{Специфичность}) * (1 - \text{Распространенность})} \times 100 \%, \quad (5)$$

где Распространенность – распространенность заболевания, %.

Расчет прогностической ценности отрицательного диагноза, определяющей вероятность отсутствия заболевания при отрицательном тесте, проводили по формуле

$$NPV = \frac{\text{Специфичность} * (1 - \text{Распространенность})}{(1 - \text{Специфичность}) * \text{Распространенность} + \text{Специфичность} * (1 - \text{Распространенность})} \times 100 \% \quad (6)$$

По итогам работы был сформирован набор референтных масс-спектров экстрактов белковых профилей микроорганизмов *Brucella* spp. шести видов. Полученные результаты позволили выявить и охарактеризовать комплекс маркеров, дающий возможность проводить дифференциацию белковых профилей образцов крови больных бруцеллезом от масс-спектров проб крови условно здоровых людей.

## ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА СТАНДАРТИЗИРОВАННОГО АЛГОРИТМА ИДЕНТИФИКАЦИИ И ВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ БРУЦЕЛЛ МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

### 3.1 Оптимизация и стандартизация методики обеззараживания и подготовки проб культур возбудителя бруцеллеза при работе методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией

На основании анализа литературных источников был выбран способ обеззараживания и подготовки проб культур возбудителя бруцеллеза [98], в который в ходе исследования были внесены незначительные модификации. Отобранные для исследования пробы были инактивированы следующим способом.

К полученной суспензии добавляли 900 мкл спирта этилового 95 %, смесь тщательно перемешивали на вортексе. Полученную смесь инкубировали при температуре 30 °С в течение 90 мин. После проведенной инактивации образцы суспензии центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин, супернатант отбрасывали. Для полного удаления спирта процедуру центрифугирования повторяли.

Эффективность предложенного способа обеззараживания была подтверждена в ходе испытаний с вирулентным штаммом *B. melitensis* 548 бактериологическим и биологическим методами при участии членов комиссии по контролю соблюдения требований биологической безопасности ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. В ходе проведенных исследований было подтверждено, что предложенный способ обеззараживания не оказывает влияние на качество масс-спектров и на дальнейший ход анализа. После инактивации проб вышеописанным способом дальнейшие исследования проводятся как с обеззараженным материалом.

Таким образом, в ходе исследования был подобран и апробирован эффективный метод обеззараживания и подготовки проб культур возбудителя бруцеллеза для последующего масс-спектрометрического анализа. В ходе исследования разработан протокол MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа образцов бруцелл, включающий пробоподготовку и параметры формирования масс-спектров, который был апробирован с использованием вирулентного штамма *B. melitensis* 548.



Типичный масс-спектр инактивированной в стандартизированных условиях культуры возбудителя бруцеллеза, представлен на рис. 1.

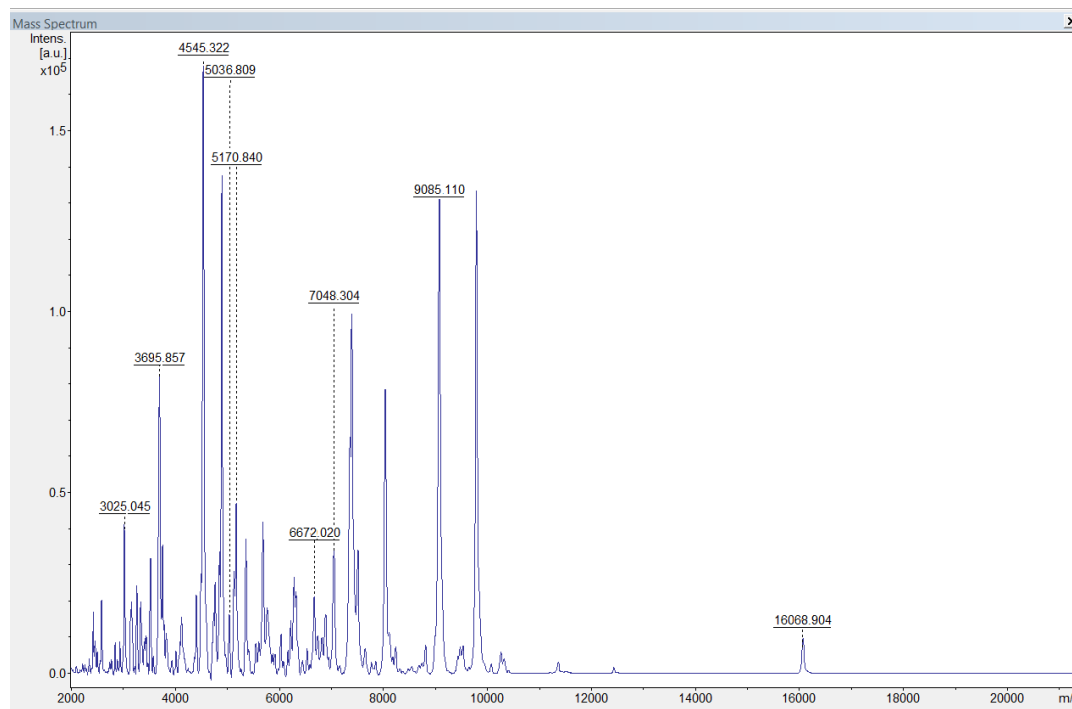


Рисунок 1 – Типичный MALDI-TOF масс-спектр образца *B. melitensis* 548 (отмечен набор фрагментов, специфичных для рода *Brucella*)

В качестве ключевых параметров для оптимизации отдельных этапов анализа нами были изучены следующие: объемное соотношение матрица/образец, подбор значения чувствительности лазера при ионизации образца. При регистрации масс-спектров апробированы следующие объемные соотношения матрица/образец: 0,5/1, 1/1, 2/1. Установлено, что использование белкового экстракта с избытком матрицы (соотношения 2/1), сопровождается неоднородной кристаллизацией на поверхности мишени, что в свою очередь затрудняет получение стабильного сигнала и негативно сказывается на воспроизводимости результатов. При соотношении матрица/образец 0,5/1 на спектрах наблюдалось значительное понижение интенсивности сигналов наряду с увеличением фрагментации. Наилучшие результаты были достигнуты при равном соотношении компонентов.

Воспроизводимость масс-профилей отдельных образцов культур бруцелл была подтверждена серией повторных измерений. При проведении масс-спектрометрического анализа проб, хранившихся до трех суток при температуре минус 76 °С, изменений основных характеристик сигналов масс-спектров не выявлено. Полученные данные

белкового профилирования штаммов возбудителя бруцеллеза согласуются с результатами более ранних работ [98]. Таким образом, в работе был подобран оптимальный режим проведения масс-спектрометрического анализа белковых экстрактов штаммов возбудителя бруцеллеза, обеспечивающий воспроизводимое получение качественных белковых профилей.

### 3.2 Подготовка культур возбудителя бруцеллеза для исследования методом MALDI-TOF MS, экспериментальное обоснование использования агара Альбими

Влияние культивирования бруцелл на различных средах на масс-спектры экстрактов выращенных штаммов, полученных с использованием стандартизированной процедуры пробоподготовки, оценивали на примере анализа белковых экстрактов вакцинных штаммов *B. melitensis* Rev-1 и *B. abortus* 19 ВА, полученных на агаре Альбими, бруцеллагаре и эритрит-агаре (рисунок 2, 3).

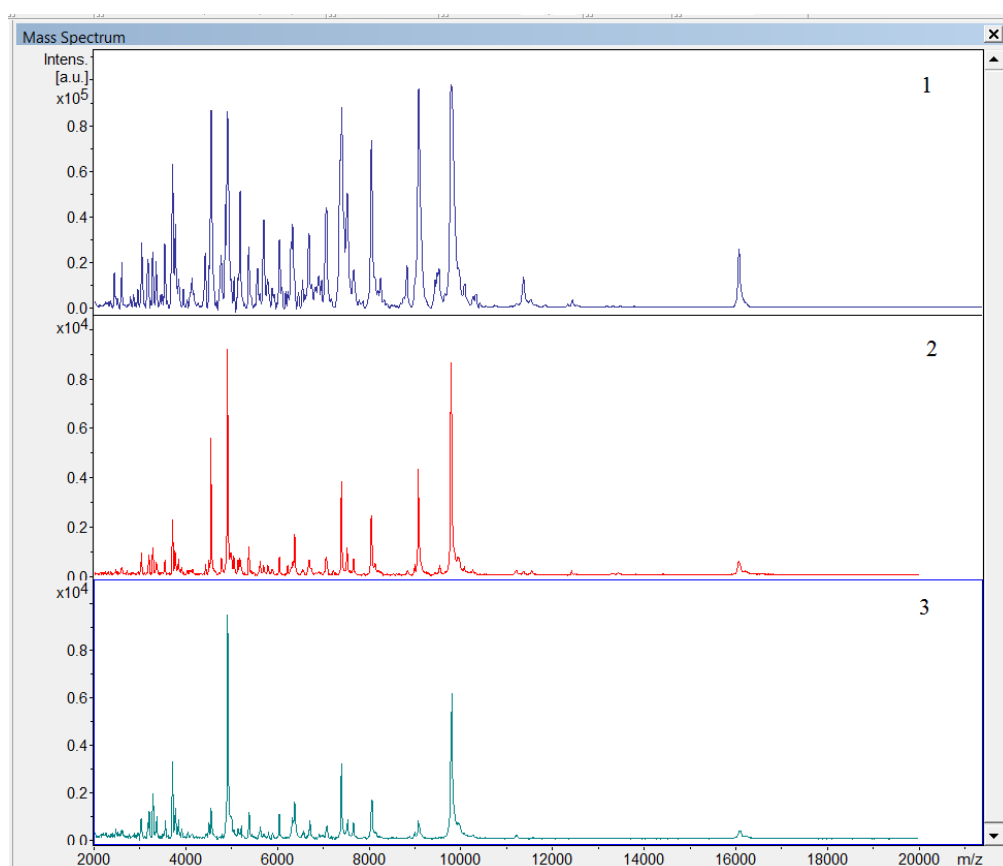


Рисунок 2 – MALDI-TOF MS профили белковых экстрактов вакцинного штамма *B. melitensis* Rev-1, полученных на агаре Альбими (1), бруцеллагаре (2) и эритрит-агаре (3)

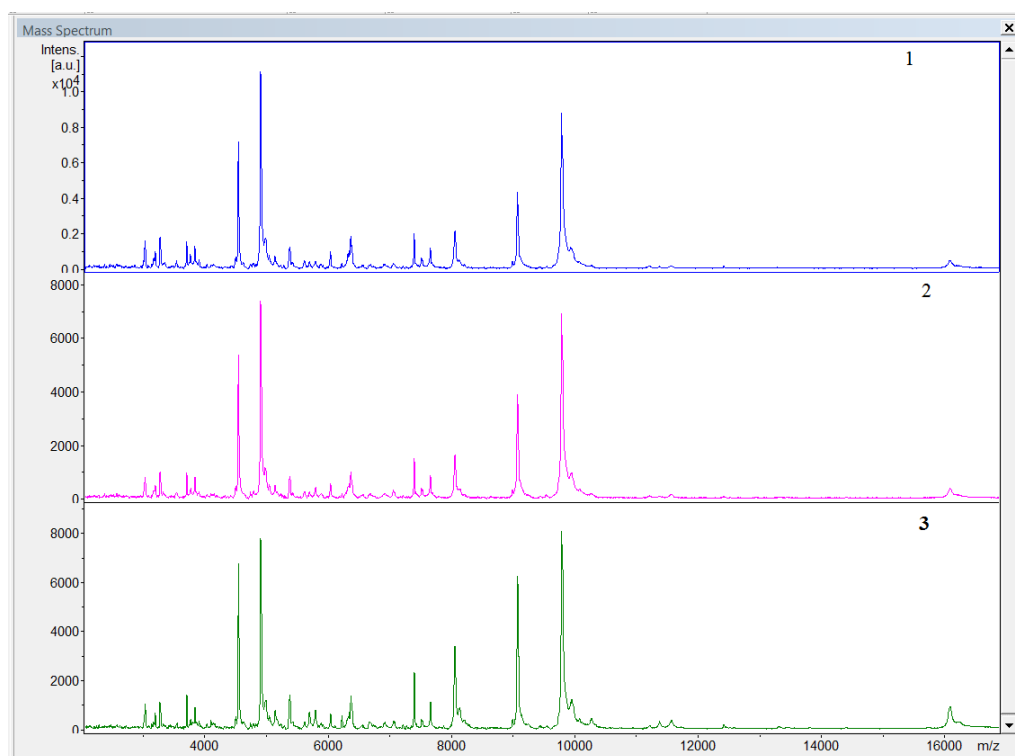


Рисунок 3 – MALDI-TOF MS профили белковых экстрактов вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА, полученных на агаре Альбими (1), бруцеллагаре (2) и эритрит-агаре (3)

Воспроизводимость результатов анализа была подтверждена путем исследования пяти культур каждого штамма, выращенных в стандартных условиях на каждой из выбранных питательных сред. При проведении сравнительного анализа соответствующих белковых экстрактов, полученных в одинаковых условиях, изменений качественного состава масс-спектров не выявлено. Данные белкового профилирования штаммов возбудителя бруцеллеза, в целом, согласуются с результатами более ранних работ [71].

В ходе работы было зарегистрировано 630 масс-спектров для десяти культур искомого возбудителя. По результатам сравнительного анализа пиков на спектрах бруцелл был выявлен ряд особенностей. В частности, общее число идентифицированных пиков на масс-спектрах для штамма *B. melitensis* Rev-1, культивированных на агаре Альбими, бруцеллагаре и эритрит-агаре составило  $77 \pm 3$ ,  $65 \pm 5$  и  $41 \pm 4$  соответственно. Для штамма *B. abortus* 19 ВА, при использовании вышеуказанных питательных сред, суммарное количество сигналов составило  $96 \pm 5$ ,  $89 \pm 4$ , и  $52 \pm 4$  соответственно. В процессе предварительного анализа было отмечено, что основное количество зафиксированных пиков локализовано в интервале значений масс 3000-7000 и 11000-12000 Да.

Наибольшее количество сигналов было зарегистрировано на белковых профилях бруцелл, культивируемых на агаре Альбими, что обусловлено, на наш взгляд, оптимальным количеством азота, углерода, и максимальным ростостимулирующим эффектом.

Анализ масс-спектров белковых экстрактов культур возбудителя бруцеллеза, культивированных в течение 24, 48, и 72 ч на каждой из тестируемых питательных сред, позволил установить влияние времени инкубации на качество получаемых данных. Установлено, что интенсивность сигналов на масс-спектрах штаммов бруцелл с продолжительностью инкубации 48 ч была максимальной, в то же время, при сокращении до 24 ч наблюдалось снижение интенсивности (на  $20 \pm 5\%$ ) анализируемых пиков. С увеличением времени инкубации до 72 ч интенсивность сигналов на масс-спектрах не изменялась, что, возможно, вызвано переходом бактерий в позднюю стационарную фазу роста (сокращение метаболической деятельности), сопровождающуюся истощением питательных веществ. Дальнейшее увеличение периода инкубации патогена, на наш взгляд, приведет к качественному изменению состава белковых профилей бруцелл, что, очевидно, может значительно повлиять на результаты идентификации с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Абсолютная интенсивность мажорных пиков на полученных масс-спектрах в случае использования агара Альбими составила: (a.i.)  $35187 \pm 530$ ,  $48698 \pm 435$ ,  $54751 \pm 560$ , что существенно превосходит аналогичные сигналы для исследуемых образцов белковых экстрактов с использованием бруцеллагара ( $13810 \pm 240$ ,  $15035 \pm 310$ ,  $13845 \pm 295$  соответственно) и эритрит-агара ( $11281 \pm 150$ ,  $11692 \pm 220$ ,  $12877 \pm 200$  соответственно).

Сравнительный анализ групп специфичных пиков на полученных масс-спектрах позволил установить стабильность их состава в белковых портретах бруцелл независимо от используемой питательной среды, что, в свою очередь, подтверждает предположение о консервативности состава основных белков возбудителя в исследуемом диапазоне, в том числе рибосомных. Все исследуемые спектры возбудителя бруцеллеза содержали общий набор из 17 сигналов в интервале масс 2000 – 20000 Да, отличающихся по интенсивности ( $m/Z \pm 5$  Да): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068. При этом экспериментально было установлено, что относительная интенсивность отдельных сигналов белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза напрямую зависит от свойств питательной среды.

Пределные концентрации компонентов агара Альбими, определившие необходимые прочность по Валенту, содержание аминного азота, углеводов и витаминов, сбалансированного комплекса минеральных солей, оптимального для достаточного роста и выхода биомассы культур возбудителя бруцеллеза, в то же время, обеспечили высокую интенсивность специфичных пиков при белковом профилировании методом MALDI-TOF MS. Однако, увеличение количества регистрируемых сигналов на масс-спектрах, вследствие изменения метаболических потребностей бактерии в зависимости от свойств используемого питательного субстрата, вероятно, окажет влияние на достоверность результатов проводимой идентификации исследуемого возбудителя.

Таким образом, полученные в ходе исследования результаты, в целом, подтверждают предположение о том, что применение агара Альбими в качестве питательной среды при подготовке образцов культур бруцелл для масс-спектрометрического анализа является оптимальным.

### **3.3 Формирование комплекса критериев для оценки качества референсных масс-спектров чистых культур возбудителя бруцеллеза**

Ключевым фактором обеспечения достоверности результата анализа методом MALDI-TOF MS является качество масс-спектров. На основании полученных экспериментальных данных были определены следующие критерии качества полученных данных: разрешение пиков масс-спектра, соотношение сигнал/шум, общее число идентифицированных пиков в пик-листе, их интенсивность и диапазон значений  $m/Z$ , регистрируемых в ходе анализа.

На основании данных литературы можно сделать заключение, что при сравнительном анализе идентичных фрагментов в целевой области полученных масс-спектрометрических данных наблюдается дрейф – отклонение по величине  $m/Z$  [161]. Основные причины отклонения гомологичных сигналов могут быть связаны с калибровкой прибора (аппаратный дрейф) и с изменениями, появившимися в ходе субкультивирования и роста культуры (морфологический дрейф). Влияние последнего типа может быть в значительной степени преодолено за счет стандартизации условий культивирования. Аппаратный дрейф, следуя из изменений в инструментальном

состоянии, может привести к разрозненности спектральных данных, полученных за установленный период времени, для одного и того же микроорганизма.

Помимо вышеупомянутых причин непостоянство изотопного состава белков клеток бактерий также может служить причиной увеличения дрейфа сигнала до нескольких дальтон. При анализе полученных масс-спектров возбудителя бруцеллеза для диапазона измерений от 2000 до 20000 Да были отмечены различные отклонения по величине  $m/Z$ . Минимальные отклонения от среднего значения масс ионов зафиксированы в начале установленной зоны в интервале 2000-5000 Да (до  $\pm 5$  Да), максимальный дрейф значений  $m/Z$  зарегистрирован для конечной области рабочего диапазона (до  $\pm 20$  Да), что согласуется с результатами других исследователей [161].

В результате проведенного анализа полученных пик-листов были определены следующие оптимальные значения характеристик валидного масс-спектра при анализе образцов, содержащих культуры возбудителя бруцеллеза: абсолютная интенсивность пиков  $I > 500$ , разрешение  $R > 150$ , общее число идентифицированных пиков от 65 до 100, отношение сигнал/шум – 15.

### **3.4 Разработка базы референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI BioTyper**

Создание базы референсных масс-спектров возбудителей I-II групп патогенности является необходимым этапом внедрения метода времяпролетной масс-спектрометрии в работу лабораторий микробиологического профиля, проводящих идентификацию этих патогенов.

На первом этапе с учетом оптимальных значений характеристик валидного масс-спектра, установленных нами ранее, были отобраны белковые профили бруцелл разных видов для последующего их включения в базу данных, которая может быть использована совместно с коммерческой «Bruker Daltonics».

В ходе исследования было зарегистрировано по 20 масс-спектров для каждого образца бактериальной культуры, из которых были получены MSP основных рибосомных белков для 96 штаммов *Brucella spp.*

Масс-спектры, обработанные в среде программы flexControl v.3.3.64, представляют собой графическое изображение зависимости интенсивности  $I$  (относительное

количество ионов данного вида, выраженное в %) от величины отношения массы иона к его заряду  $m/Z$  (Да), со специфичным набором пиков. В процессе предварительного анализа было отмечено, что основное количество зафиксированных пиков локализовано в интервале значений масс 3000-7000 и 11000-12000 Да.

Разработанная база масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза создана на платформе программы Biotyper DB v 3.1 Offline Classification и может быть использована совместно с базой данных «Bruker Daltonics». Данные систематизированы по видам возбудителя. Настоящая база данных предназначена для накопления и хранения MSP основных рибосомных белков штаммов *Brucella spp.* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis*), которые получены усреднением серии единичных спектров, что позволяет добиться большей точности и воспроизводимости результатов. В рамках процедуры идентификации происходит попарное сравнение пиков в спектре исследуемого образца с пиками эталонных суперспектров, находящихся в базе данных. Каждому сравнению с суперспектром в базе данных присваивается численный рейтинг, определенный на основании количества совпадений. По наилучшему совпадению определяется таксономическая принадлежность исследуемого объекта.

Типичные масс-спектры белковых экстрактов культур возбудителя бруцеллеза представлены на рисунках 15 – 20.

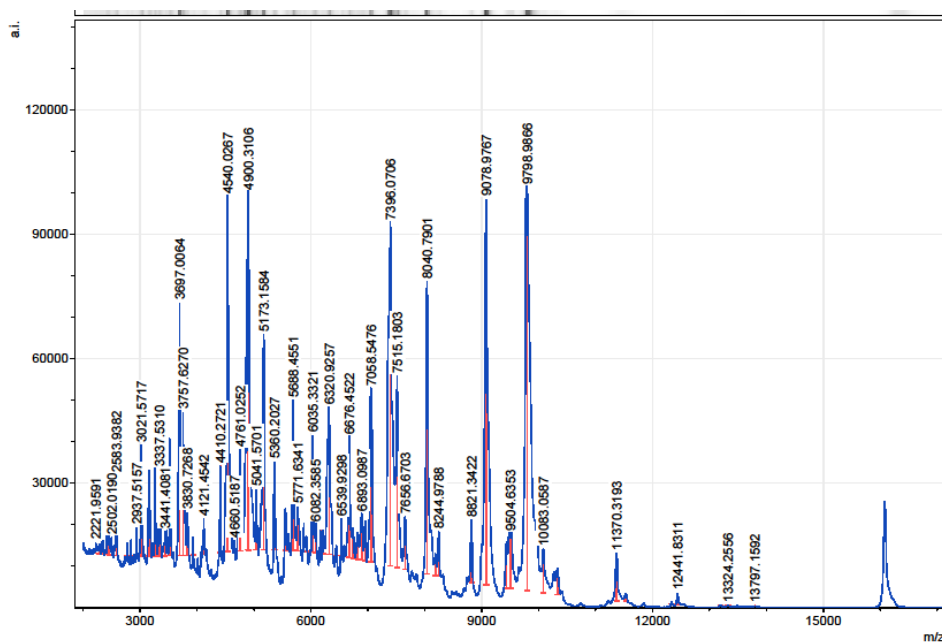


Рисунок 15 – Типичный MALDI-TOF масс-спектр белкового экстракта культуры *B. melitensis* Rev-1

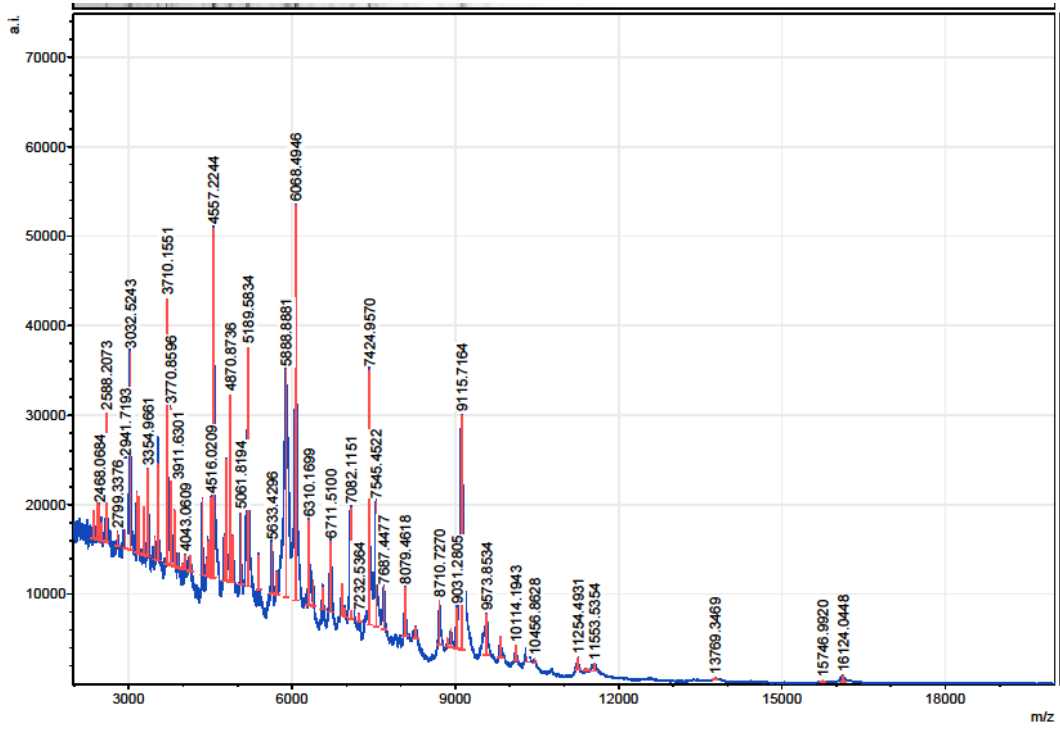


Рисунок 16 – Типичный MALDI-TOF масс-спектр белкового экстракта культуры *B. neotomae* 5K33

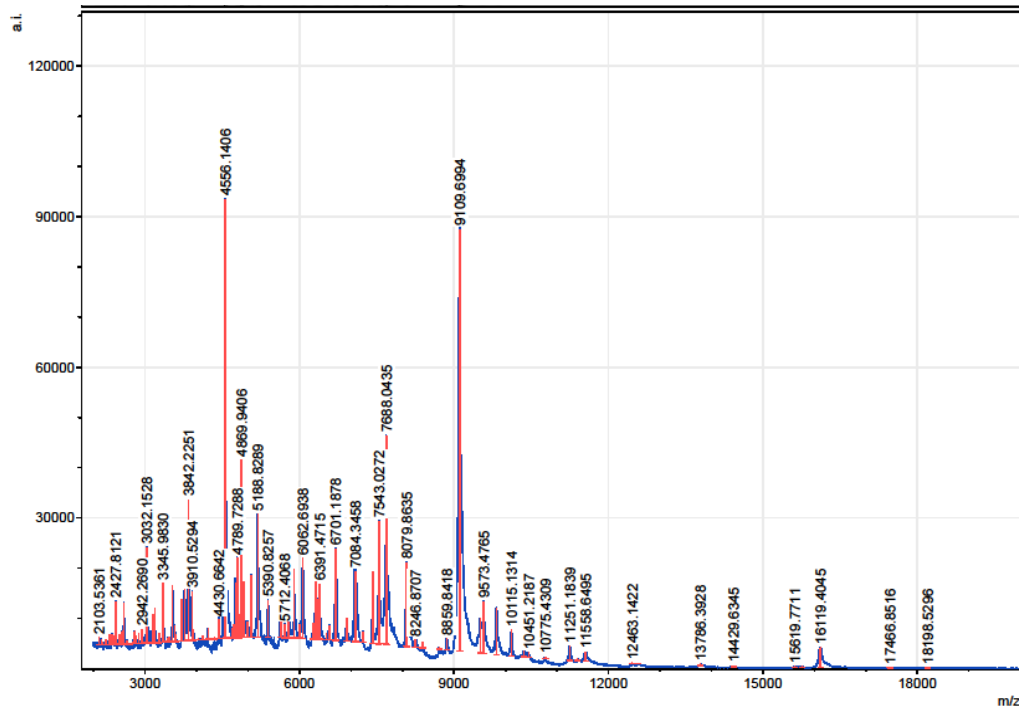


Рисунок 17 – Типичный MALDI-TOF масс-спектр белкового экстракта культуры *B. canis* 1066



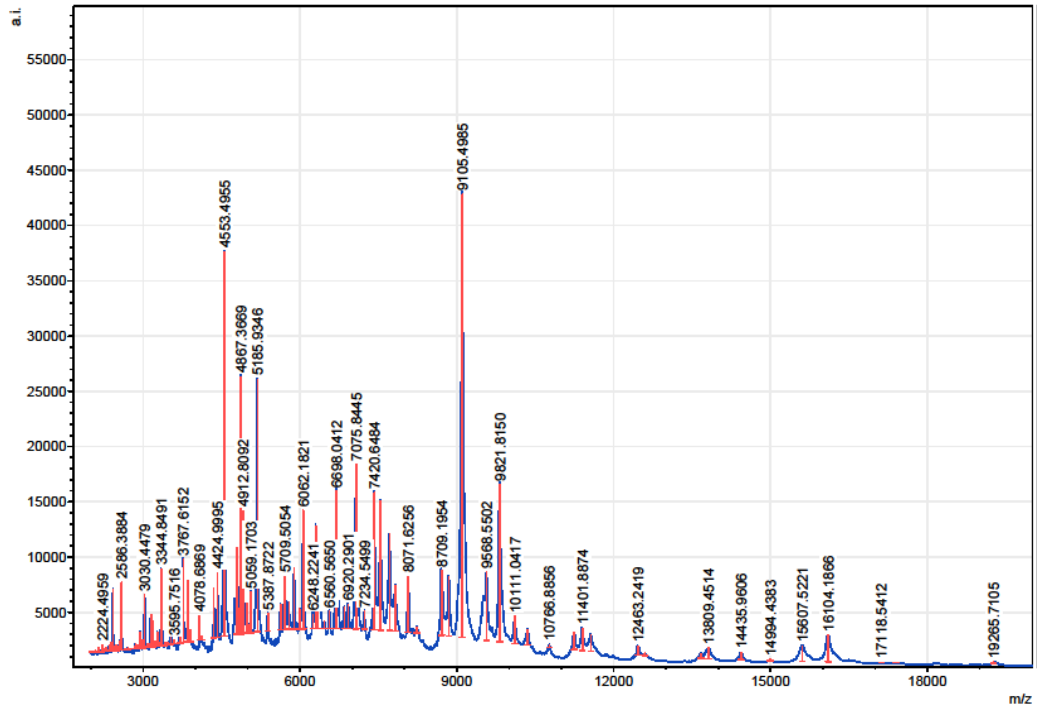


Рисунок 18 – Типичный MALDI-TOF масс-спектр белкового экстракта культуры *B. suis* 686

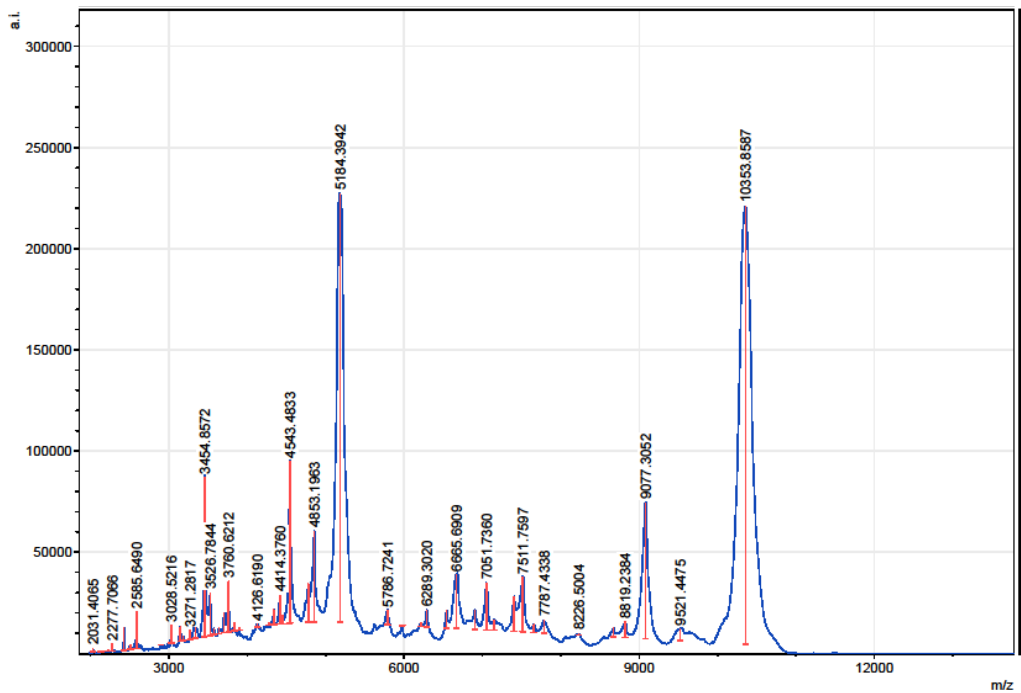


Рисунок 19 – Типичный MALDI-TOF масс-спектр белкового экстракта культуры *B. ovis* 712

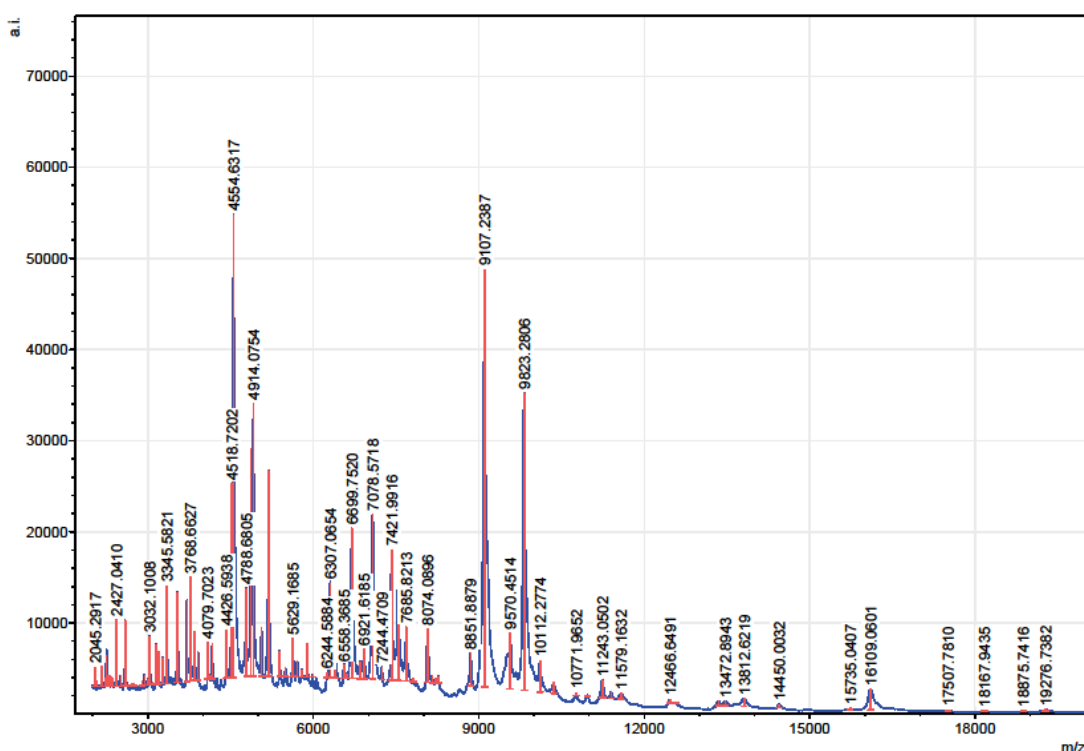


Рисунок 20 – Типичный MALDI-TOF масс-спектр образца *B. abortus* 19 VA

Анализ полученных спектров в базе данных показал низкие значения Score (менее 1,397) для всех штаммов возбудителя бруцеллеза относительно других микроорганизмов (общее количество включает более 4600 штаммов (2185 видов, 364 родов) бактерий, микобактерий и др.), на основании чего был сделан вывод о высокой специфичности исследуемых белковых профилей. С другой стороны, сравнение коллекции масс-спектров штаммов бруцелл между собой подтвердило высокую степень родства изучаемых бактерий (Score в интервале 1,946 – 3,000).

Таким образом, в ходе выполнения исследования была сформирована пополняемая база характеристичных белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза из коллекции ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, включающая 96 референсных масс-спектров. На основании анализа белковых профилей экстрактов культур бруцелл в среде Biotyper DB v 3.1 Offline Classification с применением сформированной базы данных показана высокая эффективность применения метода MALDI-TOF MS для достоверной идентификации и типирования культур возбудителя бруцеллеза. Разработанная база данных является необходимым звеном системы индикации и идентификации бруцелл при лабораторной диагностике инфекции.

### 3.5 Проведение межвидовой дифференциации штаммов *Brucella* spp. на основе данных MALDI-TOF MS

Интеграция масс-спектров культур возбудителя бруцеллеза в программный пакет Biotyper DB Offline Classification позволила сопоставить соответствие результатов белкового профилирования таксономической принадлежности по данным бактериологии (Таблица 2). В ходе масс-спектрометрического анализа культур возбудителя бруцеллеза при сравнении с расширенной базой данных для 100 % исследованных коллекционных штаммов бруцелл проведена достоверная идентификация до рода, правильная видовая принадлежность была определена для 97 % культур.

Таблица 2 – Идентификация культур микроорганизмов рода *Brucella* spp. в программе Biotyper DB v 3.1 Offline Classification

№ п/п	Исходная таксономическая характеристика штаммов по микробиологическим тестам	Результаты MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа	
		количество штаммов	Score
1	<i>Brucella abortus</i>	26	2,500-3,000
2	<i>Brucella melitensis</i>	24	2,500-3,000
3	<i>Brucella neotomae</i>	6	2,250-2,750
4	<i>Brucella ovis</i>	11	2,300-2,799
5	<i>Brucella suis</i>	26	2,300-3,000
6	<i>Brucella canis</i>	3	2,200-3,000

Известно, что показатель достоверности идентификации - Score, полученный для каждого образца культуры возбудителя, позволяет отобразить сходство белкового профиля каждого идентифицируемого штамма бруцелл при сравнении с референсным спектром из базы данных и зависит от размера базы. Так, наиболее низкие значения показателя достоверности были получены только при идентификации нескольких штаммов *B. ovis*, *B. suis*, *B. canis*, что, очевидно, может быть связано с относительно низкой их представительностью в нашей базе и вариабельностью протеома бруцелл этих видов.

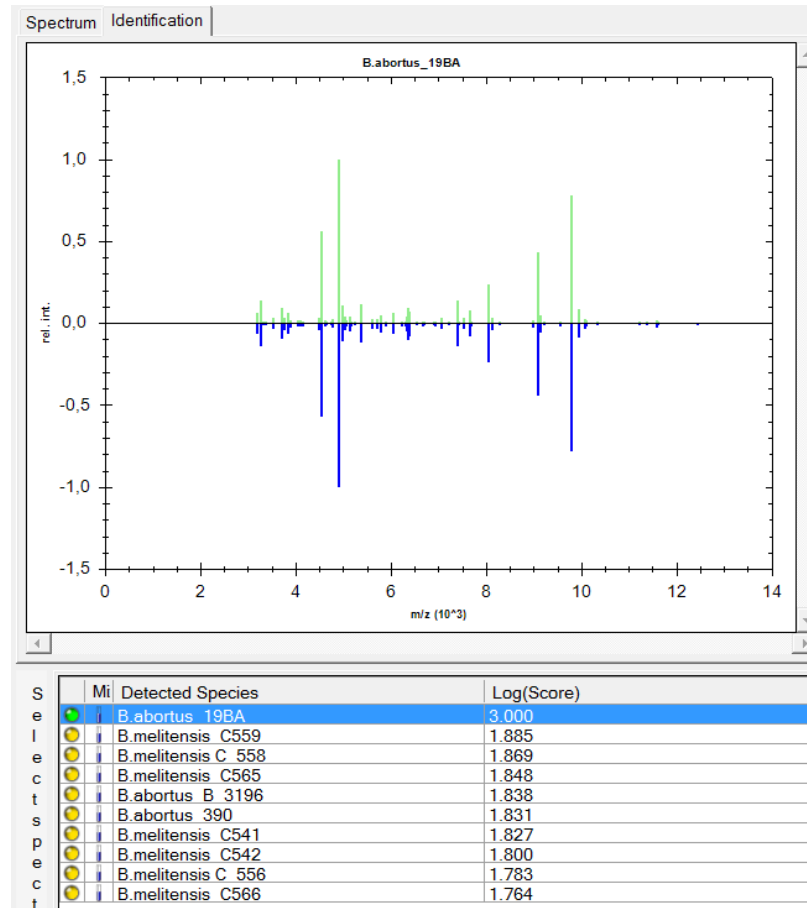


Рисунок 4 – Результат идентификации штамма *B. abortus* 19 ВА, выраженный в виде Score

Наивысшие показатели идентификации бруцелл на основании данных времяпролетной масс-спектрометрии в программе Biotyper DB v 3.1 Offline Classification были получены при сравнении штаммов самих с собой. Как можно отметить (рисунок 4) при сравнении штамма *B. abortus* 19 ВА со штаммами *B. melitensis* значение Score относительно выше, чем при сравнении представителей в пределах вида.

S	Mi	Detected Species	Log(Score)
e	●	B.suis_I_72	3.000
l	●	B.suis_524	0.809
e	●	B.suis_686	0.809
c	●	B.melitensis_C_561	0.676
t	●	B.melitensis_C552	0.626
s	●	B.abortus_420	0.605
p	●	B.canis_6_66	0.580
e	●	B.suis_522	0.547
c	●	B.suis_517	0.478
t	●	B.melitensis_C543	0.468

Рисунок 5 – Результат идентификации штамма *B. suis* I-72, выраженный в виде Score

Аналогичная ситуация наблюдается и для представителей *B. suis*, для которых Score составляет менее единицы, что, вероятно, может быть обусловлено низким сходством белковых профилей представителей этого вида (рисунок 5).

Помимо идентификации бруцелл на уровне рода и вида, нами был проведен сравнительный анализ полученных данных с целью выявления их сходства с использованием следующих математических подходов: построение дендрограмм (MSP-dendrogram), проведение анализа PCA в форме кластера (от англ. PCA-clustering) и дендрограмм (от англ. PCA-dendrogram), расчет матрицы составного индекса корреляции (от англ. matrix of Compose Correlation Index, CCI-matrix).

MSP-дендрограмма позволяет представить полученные данные в формате иерархической структуры, где положение каждого спектра определяется степенью отклонения характеристик его пиков относительно средних показателей этих характеристик в кластере спектров, расположенных выше в иерархии (рисунок 6, 7).

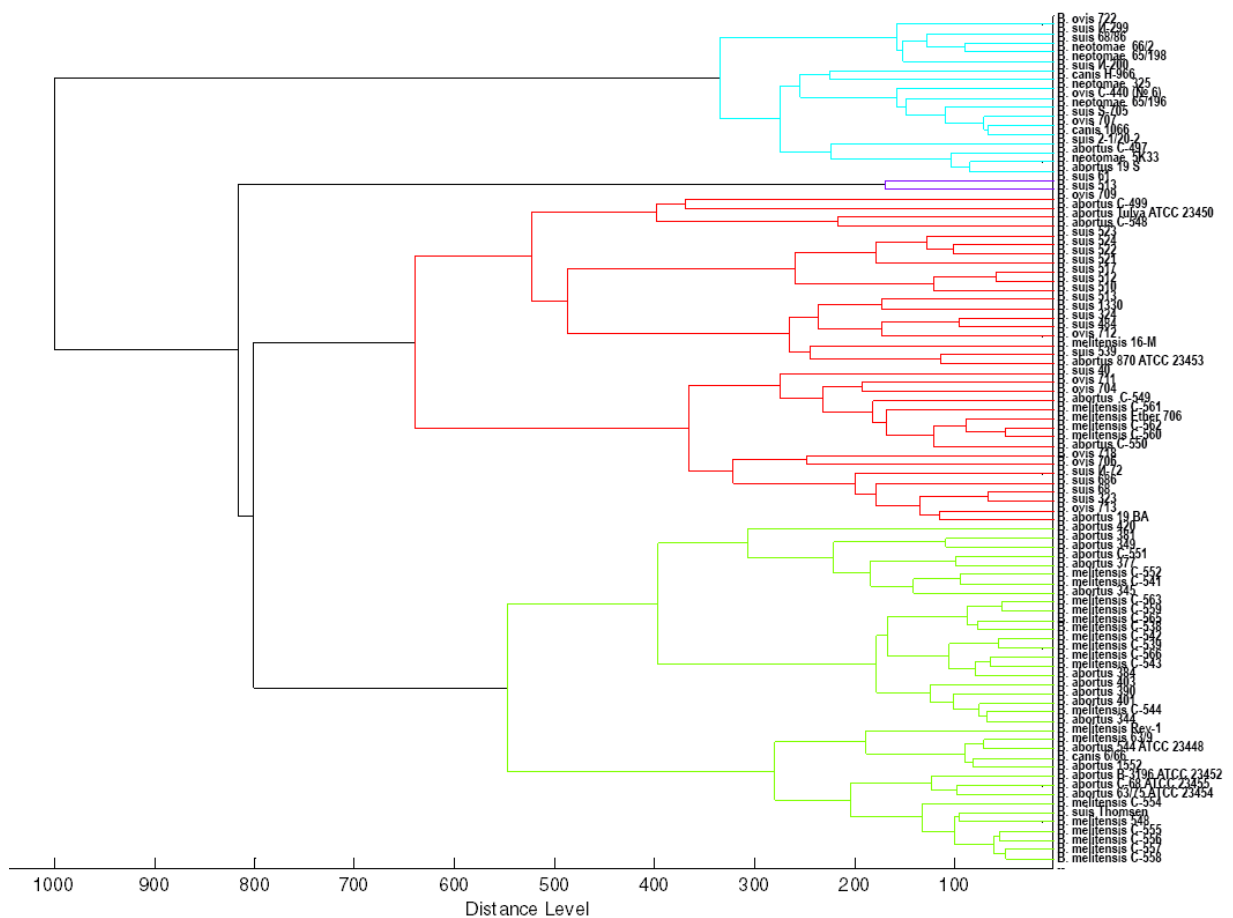


Рисунок 6 – Фрагмент дендрограммы, построенной на основании кластерного анализа (алгоритм Chebychev-ward) штаммов возбудителя бруцеллеза с использованием данных MALDI-TOF MS

Анализ дендрограмм (рисунок 6, 7), построенных на основании данных MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием программного пакета «Biotyper DB v 3.1 Offline Classification», позволил выявить генетически родственные кластеры, что, главным образом, согласуется с ранее полученными нами данными. Следует отметить, что результаты кластерного анализа, полученные с использованием разных алгоритмов из указанного программного пакета, могут иметь значительные отличия. Учитывая результаты филогенетического анализа на основании данных молекулярно-генетических методов, в качестве основного в работе был выбран алгоритм Chebychev.

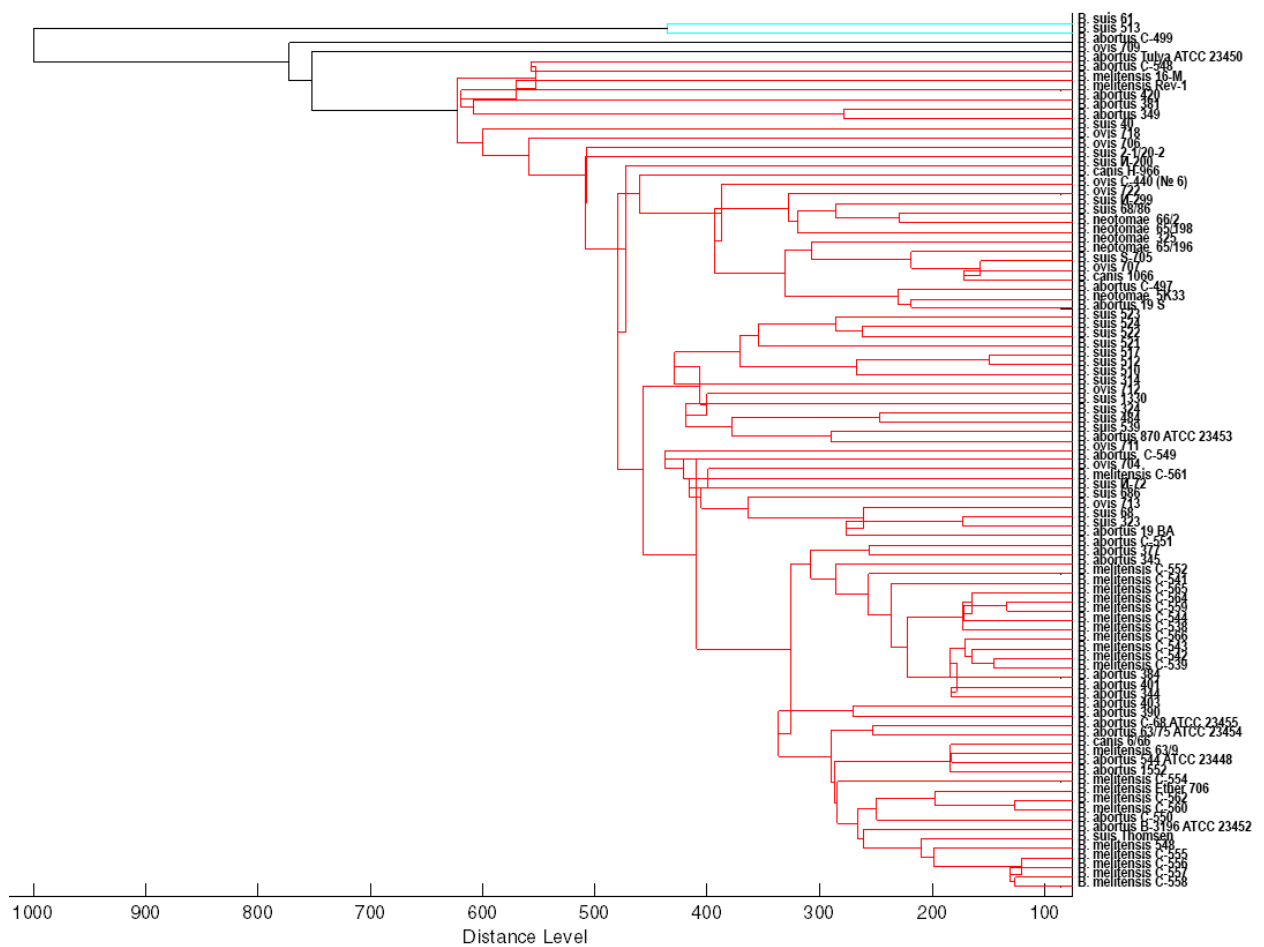


Рисунок 7 – Фрагмент дендрограммы, построенной на основании кластерного анализа (алгоритм Chebychev-median) штаммов возбудителя бруцеллеза с использованием данных MALDI-TOF MS

Кластерный анализ масс-спектров культур возбудителя бруцеллеза с использованием интегрированных инструментов программного пакета Biotyper DB v 3.1 Offline Classification позволил наглядно отобразить близость белковых профилей представителей разных видов *Brucella* spp. Как видно на дендрограмме (рисунок 6, 7),

штаммы *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis* формируют смешанные группы в соответствии с их таксономическим положением. При этом штаммы *B. abortus* и *B. melitensis* располагаются в чередующихся соседних кластерах, что подтверждает близкое родство этих видов и согласуется с литературными данными [71].

Полученные в работе данные позволяют сделать следующие выводы:

- кластерный анализ штаммов бруцелл на основании данных MALDI-TOF MS не позволяет проводить однозначную общепринятую межвидовую дифференциацию культур возбудителя, которая согласуется с соответствующими результатами молекулярно-генетических и иных методов;

- на основании данных масс-спектрометрии штаммы бруцелл видов *melitensis* и *abortus*, как правило, группируются в родственный кластер;

- основная часть штаммов *B. suis* образует родственный кластер, однако отдельные штаммы этого вида при выборе разных алгоритмов анализа могут входить в смешанные кластеры со штаммами других видов;

- штаммы *B. canis*, *B. neotomae* и *B. ovis* входят в смешанные кластеры или формируют отдельные удаленные кластеры;

- вакцинные штаммы *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 19 ВА формируют отдельный кластер.

Таким образом, использование указанного подхода для межвидового типирования штаммов возбудителя бруцеллеза не эффективно, что также подтверждается относительно высокими значениями показателей различия (Distance Level) для смешанных кластеров, включающих разные виды бруцелл.

Классификацию масс-спектрометрических данных осуществляли с использованием метода PCA, который является наиболее универсальным подходом для выборок, в которых каждую единицу наблюдения характеризует большой перечень параметров. Такую единицу наблюдения в нашем исследовании представляет собой масс-спектр образца культуры возбудителя, содержит порядка 100 пиков, каждый из которых характеризуется собственными значениями  $m/Z$ , интенсивности, разрешения сигнала и др. PCA-кластер – представление объектов выборки в виде совокупности точек в трехмерной системе координат. Степень близости расположения точек в кластере соответствует сходству характеристик сигналов белковых профилей штаммов.

Визуализация данных, основанная на использовании метода главных компонент (рисунок 8) с использованием программного пакета «Biotyper DB v 3.1 Offline Classification», позволила воспроизвести распределение штаммов возбудителя бруцеллеза разных видов в декартовой системе координат. Детальный анализ показал, что подобное разделение согласуется с видовой принадлежностью далеко не для всех исследуемых штаммов. В частности, отдельные кластеры включали не только представителей *B. abortus* и *B. melitensis*, но и другие виды. Группирование штаммов *B. canis*, *B. ovis* и *B. suis*, представленное на диаграмме, также противоречило их видовой принадлежности.

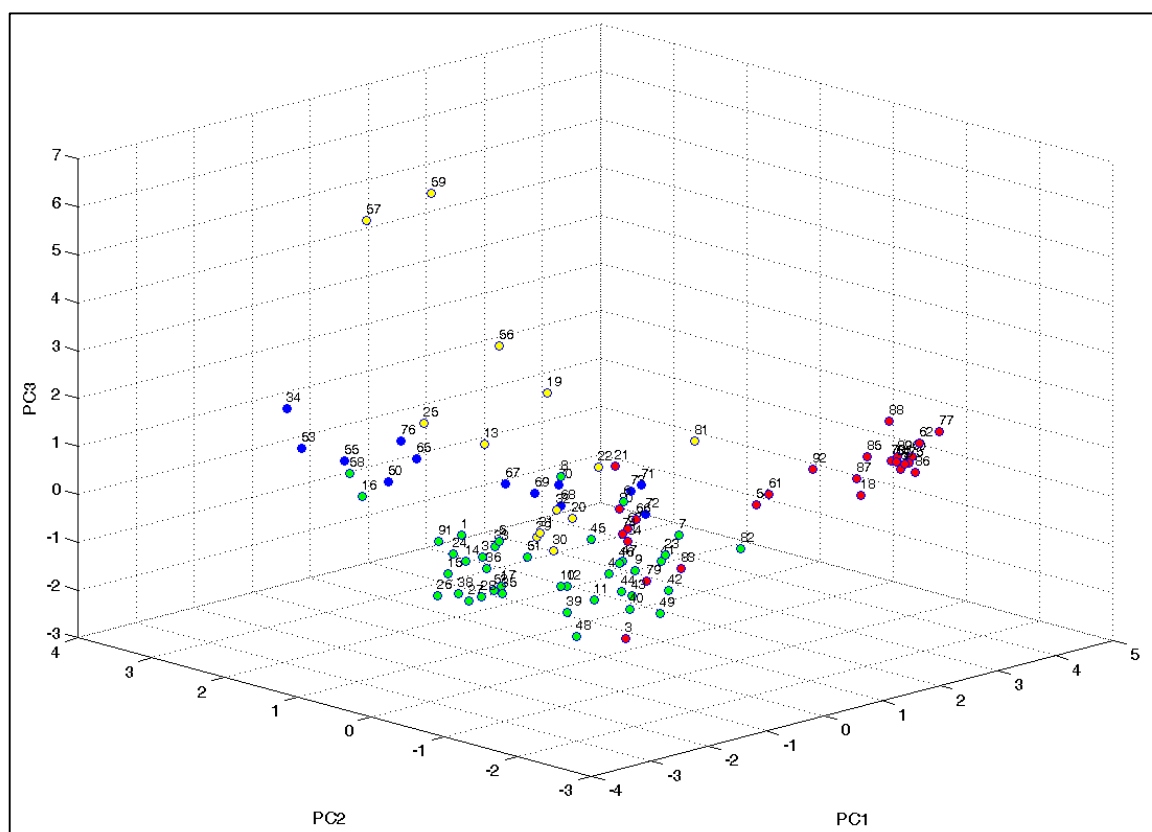


Рисунок 8 – Кластерное распределение MS профилей штаммов различных видов бруцелл по результатам анализа методом PCA (PC1, PC2, PC3 - главные компоненты; значения на осях – координаты объектов в пространстве главных компонент)

В качестве альтернативного подхода для интерпретации полученных масс-спектрометрических данных использовали один из широко применяемых способов для сравнительного анализа массивов данных – многомерное шкалирование (MDS от англ. multidimensional scaling), который не требует, чтобы исследуемые данные подчинялись многомерному нормальному распределению. В качестве исходных данных использовали



произвольный тип матрицы сходства объектов. Результатом применения алгоритма MDS явились числовые значения координат, соответствующие каждому объекту в новой системе координат, с размерностью нового пространства признаков существенно меньшей по сравнению с размерностью исходного (рисунок 9).

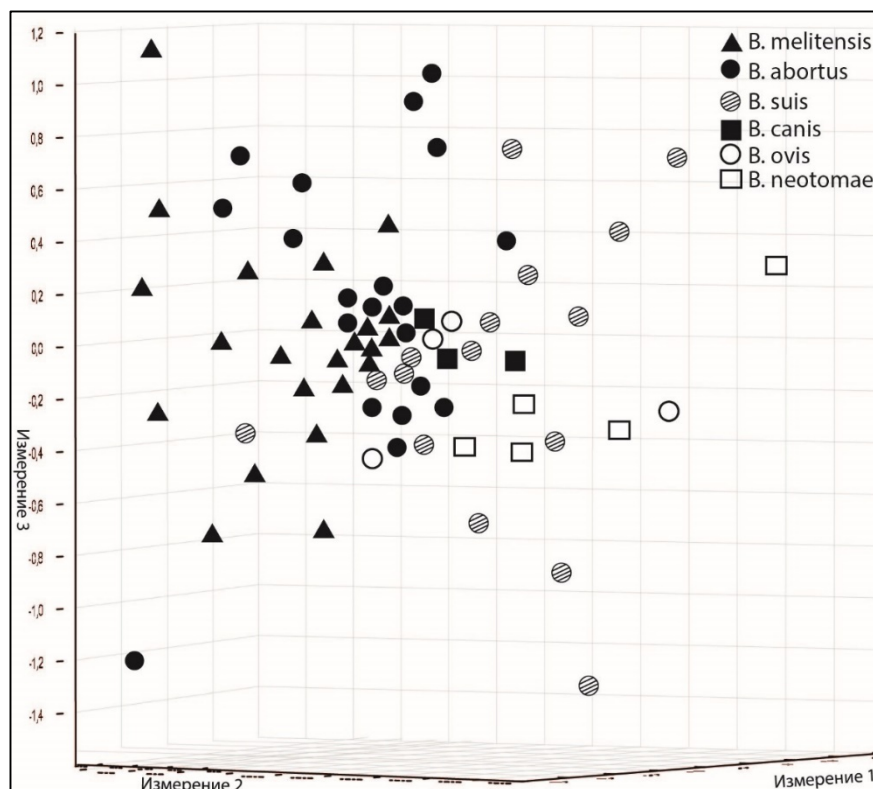


Рисунок 9 – Диаграмма распределения штаммов возбудителя бруцеллеза средствами MDS (координатные оси (измерение 1, 2, 3) – факторы, определяющие расхождение между объектами в построенном пространстве: ось абсцисс – отсутствие/присутствие пика, ось ординат – значение  $m/Z$  сигнала, ось аппликата – интенсивность сигнала).

На диаграмме представлены кластеры, образованные представителями разных видов возбудителя бруцеллеза. В качестве факторов, определяющих различия между кластерами, выступали координатные оси построенного пространства. Использование 3D-моделирования средствами MDS для пространственной визуализации представителей отдельных видов бруцелл на основании сходства/различий их белковых профилей имеет важное преимущество – распределение изучаемых профилей в трехмерном пространстве с возможностью динамического изменения угла обзора. В построенной системе координат между представителями видов *B. abortus* и *B. melitensis* наблюдается относительно меньшая дистанция по сравнению с *B. suis*. В то же время, для штаммов *B. neotomae* отмечена относительно большая близость с представителями вида *B. suis*.



диагональ). По обе стороны от диагонали расположены результаты сравнения масс-спектров для разных штаммов. Мозаика «теплых» и «холодных» цветов для штаммов бруцелл в пределах каждого вида свидетельствует о неоднородности профилей масс-спектров экстрактов белков между образцами и отражает внутривидовую гетерогенность возбудителя. При сравнении масс-спектров для разных видов *Brucella* spp. получены наименьшие по величине значения составного индекса корреляции ССІ (представлены на карте холодными цветами), что подтверждает высокую специфичность полученных масс-спектров для представителей разных видов возбудителя.

Group Name	Match
B.abortus 544	1.019
B.canis 6 66	0.935
B.melitensis 63 9	0.891
B.suis Thomsen	0.859
B.melitensis C 557	0.837
B.melitensis C 556	0.834
B.abortus 1552	0.821
B.melitensis C 555	0.803
B.abortus B 3196	0.789
B.melitensis 548	0.771
B.melitensis C565	0.751
B.abortus 344	0.728
B.melitensis C552	0.726
B.melitensis C538	0.71
B.abortus 345	0.674
B.melitensis C544	0.673
B.melitensis C 554	0.669
B.melitensis C543	0.669

Рисунок 11 – Идентификация штаммов возбудителя бруцеллеза на основании данных ССІ-матрицы, полученной в ходе статистического анализа соотношения данных MALDI-TOF MS

Так, на рисунке 11 представлено распределение штаммов возбудителя бруцеллеза на основании ССІ-матрицы. Исходя из представленных данных наибольшей близостью характеризуются изоляты *B. melitensis* C-556 и *B. melitensis* C-557, которые были выделены при одной вспышке из крови больных людей в июле 2012 г. (Республика Дагестан, РЦИБ г. Махачкала, Хунзахский район, с. Ората). Однако такой результат идентификации бруцелл можно считать относительно достоверным, о чем свидетельствует желтый маркер.

Для изолятов *B. melitensis* C-555 и *B. melitensis* C-554 наблюдается наименьшее соответствие (показатель Match). Очевидно, это может быть связано с тем, что изоляты поступили в июле 2012 г., но из других мест: *B. melitensis* C-555 (Республика Дагестан, РЦИБ г. Махачкала, Шамильский район, с. Мочох) и *B. melitensis* C-554 (Республика

Дагестан, РЦИБ г. Махачкала, Тарумовский район, с. Новодмитриевка). Для изолятов *B. melitensis* С-543 и *B. melitensis* С-544 были получены низкие показатели соответствия при сравнении с вышеописанными штаммами, что является не достоверным (красный маркер).

Вероятно, использование указанного статистического подхода может быть полезным при установлении степени родства изолятов, выделенных при одной вспышке, но только с использованием дополнительных средств анализа данных.

В работе при интерпретации данных MALDI-TOF MS и относительно малых дистанционных расстояний при 3D визуализации был апробирован прикладной пакет биоинформационного анализа RGL в среде языка программирования «R». В качестве исходных данных использовали пик-листы масс-спектров, обуславливающих особенности признаков для бруцелл разных видов. На рисунке 12 представлена 3D диаграмма рассеяния, полученная с помощью указанного пакета.

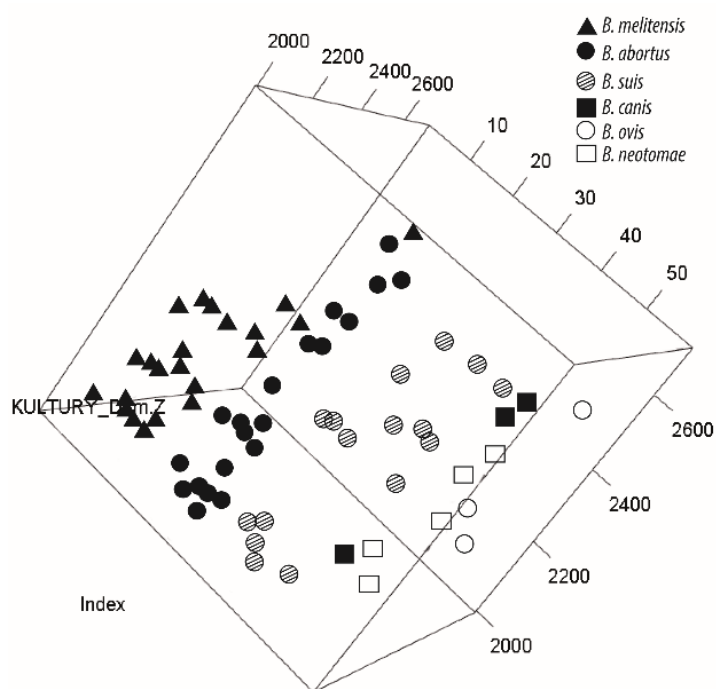


Рисунок 12 – 3D диаграмма рассеяния, полученная с помощью пакета RGL в среде языка статистического программирования R

На 3D диаграмме рассеяния, несмотря на существенные отличия масс-спектрометрических характеристик полученных белковых профилей, четко визуализируются три группы объектов, соответствующие штаммам *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* согласно их видовой принадлежности (направление движения по диаграмме слева направо). Наиболее удаленную группу составили представители *B. ovis*.

Отмечена близость расположения штаммов *B. canis* и *B. neotomae* к группе *B. suis*. Однако представляется возможным разделение указанных кластеров при изменении «точки обзора».

Полученные результаты демонстрируют эффективность применения прикладных пакетов в среде языка статистического программирования «R» для биоинформационной обработки данных времяпролетной масс-спектрометрии белковых экстрактов культур в целях межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза, имеющих клиническое значение: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*. Выявленные сложности межвидовой дифференциации штаммов на основе белкового профилирования близкородственных видов бруцелл, вероятно, позволит снизить использование алгоритмов биоинформационного анализа для уточнения распределения частот встречаемости видоспецифичных маркерных пиков.

### **3.6 Определение на масс-спектрах штаммов *Brucella* spp. сигналов, специфичных для возбудителя бруцеллеза**

MALDI-TOF масс-спектрометрия – новая технология в клинической диагностике, позволяющая проводить идентификацию микроорганизмов, определять таксономическое положение неизвестных возбудителей. Данный метод включает прямой масс-спектрометрический анализ белковых экстрактов микробной клетки, в состав которого входят преимущественно рибосомные белки, являющиеся консервативными в пределах вида микроорганизма. Наблюдаемые незначительные различия качественного состава масс-спектров исследуемых бруцелл подтверждают известные факты о консервативности рибосомных белков штаммов рода *Brucella*.

На данном этапе работы был исследован качественный состав масс-спектров белковых экстрактов штаммов возбудителя бруцеллеза.

Методом MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа был проведен поиск и валидация белковых биомаркеров, специфичных для всех представителей шести видов *Brucella* spp. На всех изученных спектрах установлено наличие 17 идентичных отличающихся по интенсивности сигналов ( $m/Z \pm 5$  Да): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068.

Фрагменты типичных белковых профилей культур возбудителя бруцеллеза представлены на рисунке 13.

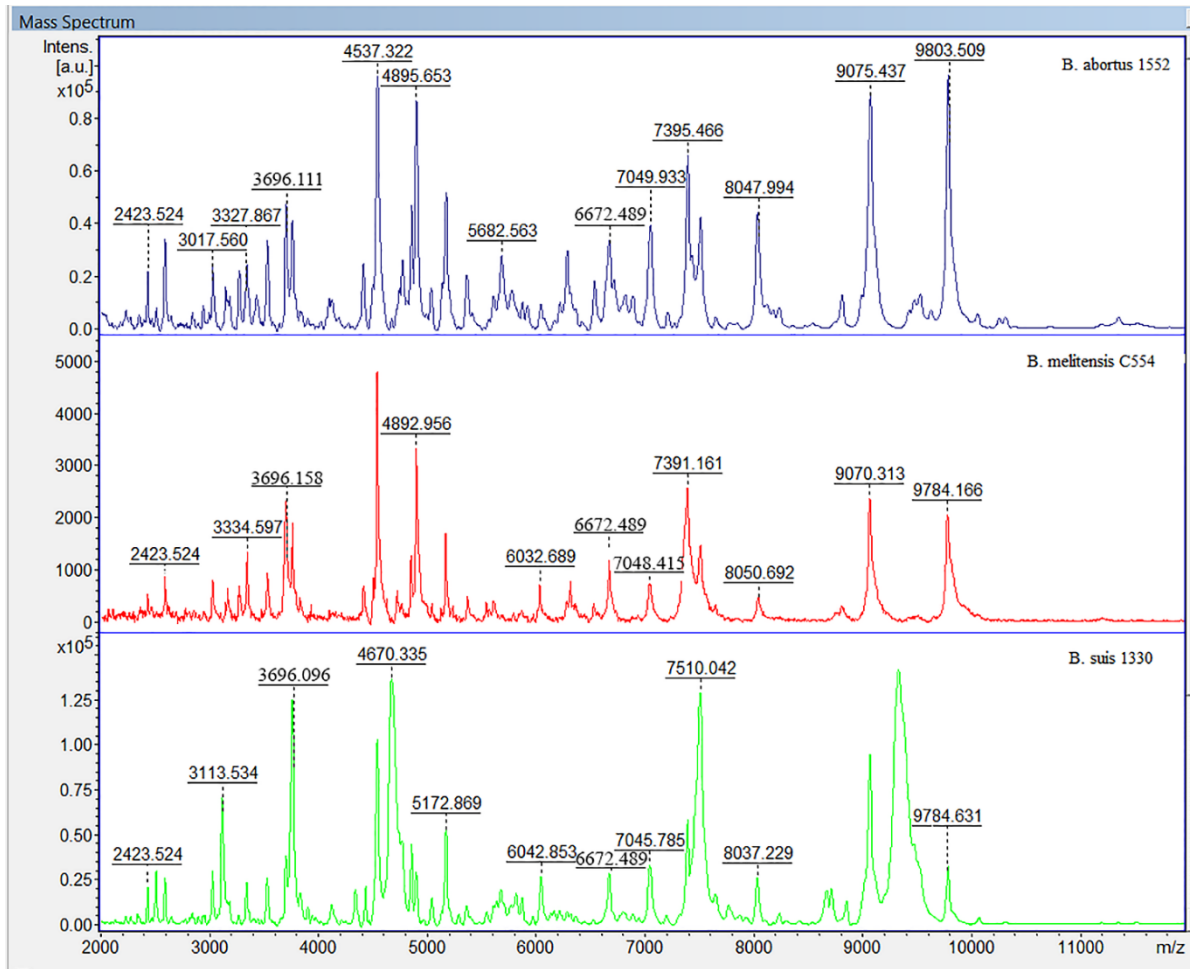


Рисунок 13 – Фрагменты масс-спектрометрических профилей белковых экстрактов культур возбудителя бруцеллеза

Учитывая высокую степень сходства белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза в исследуемом диапазоне  $m/Z$  было отмечено присутствие сигналов, общих в пределах рода *Brucella* и для каждого из видов. Некоторые из выявленных нами общих для бруцелл пики ( $m/Z \pm 5$  Да): 2426, 2585, 3337, 3754, 3680, 5168, 6672, 7042, 9074, 9103, 9787, описаны в работе Ferreira с соавт. [71]. Полученные нами данные о маркерах возбудителя бруцеллеза представлены и у других исследователей с указанием специфичных маркеров для трех видов, в частности для *B. abortus* обнаружено четыре пика:  $4852,5 \pm 1,1$  Да,  $7509,6 \pm 0,5$  Да,  $9052,4 \pm 35,2$  Да и  $9788,5 \pm 1,9$  Да; для штаммов *B. suis* четыре пика:  $4851,8 \pm 0,5$  Да,  $5828,0 \pm 2,7$  Да,  $8374,0 \pm 2,0$  Да и  $9063,5 \pm 23,0$  Да и три сигнала для *B. melitensis*:  $7326,8 \pm 1,4$  Да,  $7838,2 \pm 13,5$  Да и  $9073,3 \pm 2,1$  Да [127]. Кроме того, по данным этой же группы исследователей, в ходе анализа белковых профилей близкородственных бруцеллам

микроорганизмов *Rhizobium*, *Mesorhizobium* и *Ochrobactrum* были определены сигналы, отличные от установленных для штаммов возбудителя бруцеллеза, в диапазоне от  $3094,9 \pm 28,7$  Да до  $12\ 442,3 \pm 1,412,6$  Да.

Помимо родо- и штаммоспецифичных были отмечены группы видоспецифичных маркерных пиков, встречающихся у представителей видов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*. В частности, для штаммов *B. abortus* были определены следующие видоспецифичные сигналы ( $m/Z \pm 5$  Да): 2598, 3909, 4805, 7180, 7605, 7860, 8234, 10058, 11756, 13750, 14418; для представителей вида *B. melitensis* – 5123; *B. suis* – 5660, 6923, 11835, 16897; *B. neotomae* – 9032.

Кроме того, в пик-листах характеристичных масс-спектров исследованных штаммов было установлено наличие общих (групповых) пиков для штаммов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, что также обусловлено высокой степенью сходства белковых профилей изучаемых бактерий ( $m/Z \pm 5$  Да): 2245, 2253, 2286, 2455, 3408, 3825, 4066, 4407, 4498, 5537, 6030, 6215, 6745, 6945, 7650, 8110, 8667, 8810, 10073, 10317.

Масс-спектры большинства исследуемых штаммов содержали сигналов, специфичные для представителей двух видов бруцелл. В частности, для представителей видов *B. melitensis* и *B. canis* были отмечены следующие общие пики ( $m/Z \pm 5$  Да): 2328, 2410, 2756; *B. melitensis* и *B. suis* ( $m/Z \pm 5$  Да): 2554, 2680, 4372, 4960, 5230, 5555, 5810, 5840, 6443, 7720, 7848, 9426, 9516, 9647; *B. abortus* и *B. neotomae* ( $m/Z \pm 5$  Да): 2300, 2387, 2961, 3749, 4107, 4515, 5920, 5940; *B. suis* и *B. ovis* ( $m/Z \pm 5$  Да): 2266, 2712, 2862, 2918, 3125, 3300, 3320, 4007, 4440, 4871, 5132, 5631.

Наряду с существующей высокой стабильностью родо- и видоспецифичных групп пиков масс-спектры возбудителя бруцеллеза, в ряде случаев (до 30 % исследованных штаммов), включали значительное количество штаммоспецифичных сигналов, анализ которых позволяет проводить идентификацию патогена до уровня штамма при наличии комплекса родоспецифичных маркеров. Количество уникальных пиков в отдельных масс-спектрах варьировало от 1 (*B. abortus* 870) до 10 (*B. melitensis* С-561). Для представителей вида *B. abortus* были определены следующие штаммоспецифичные сигналов ( $m/Z \pm 5$  Да): 2234, 5267, 6111, 7306, 7476, 9634, 10204, 10512, 10971, 11034, 12487, 12944, 13420, 14993, 15512, 16021, 16052, 16480, 19317, 19586; *B. melitensis* ( $m/Z \pm 5$  Да): 2420, 2525, 2870, 4297, 5364, 5740, 6580, 6020, 6640, 7364, 7590, 8290, 8757, 9125, 12400, 16860, 17011, 17351, 17387, 18112; *B. suis* ( $m/Z \pm 5$  Да): 2043, 3857, 4276, 4626, 5010, 5912, 6833, 8466, 8523, 9251,

9408, 11807, 12631, 12886, 13674, 14851, 16580, 16725, 16985, 18098, 17222, 17830, 17912, 18141, 18434, 18690; *B. canis* (m/Z  $\pm 5$  Да): 2877, 4395, 7164; *B. neotomae* (m/Z  $\pm 5$  Да): 8586, 8737, 10372, 10597, 13254, 13733; *B. ovis* (m/Z  $\pm 5$  Да): 2904, 3022, 3048, 3064, 3081, 3256, 3310, 6192, 9690, 9850.

Результаты анализа белковых профилей близкородственных бруцеллам микроорганизмов *Rhizobium*, *Mesorhizobium* и *Ochrobactrum*, представленные в работе Sali с соавт. (2018) подтверждают уникальность установленных нами родо-, видоспецифичных маркеров [127].

Полиорганный характер поражений и формирующийся в связи с этим полиморфизм клинических симптомов значительно затрудняют клиническую диагностику бруцеллеза, особенно на ранних стадиях (острый бруцеллез). В связи с чем, нами было проведено сопоставление сигналов, выявленных нами для бруцелл, со специфичными маркерами возбудителей инфекций, характеризующихся схожими клиническими проявлениями, в частности: *Coxiella burnetii* [135] и *Yersinia pseudotuberculosis* [93]. Сравнительный анализ с масс-спектрометрическими данными зарубежных ученых позволяет наглядно подтвердить специфичность выявленных нами маркеров для представителей шести видов *Brucella* spp., которые, на наш взгляд, могут быть использованы для специфичной детекции возбудителя бруцеллеза в материале от больных.

Кроме того, был проведен сравнительный анализ полученных данных с масс-спектрами бактерий *Y. pseudotuberculosis* и *Ochrobactrum* spp., которые представлены в открытом доступе [<https://zenodo.org>]. Расположение бруцелл относительно микроорганизмов *Ochrobactrum* spp. и *Y. pseudotuberculosis*, представленное на MSP-дендрограмме (рисунок 14), подтверждает высокую гетерогенность белковых профилей этих бактерий. Как можно отметить, бактерии рода *Brucella* spp. образуют отдельную крупную кладу с двумя субкладами (зеленая и синяя ветви) дискретную относительно штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *Ochrobactrum* spp. (красные ветви). Кроме того, для уровня разветвления кластеров бруцелл и представителей *Y. pseudotuberculosis* и *Ochrobactrum* spp. отмечались высокие значения Distance Level.



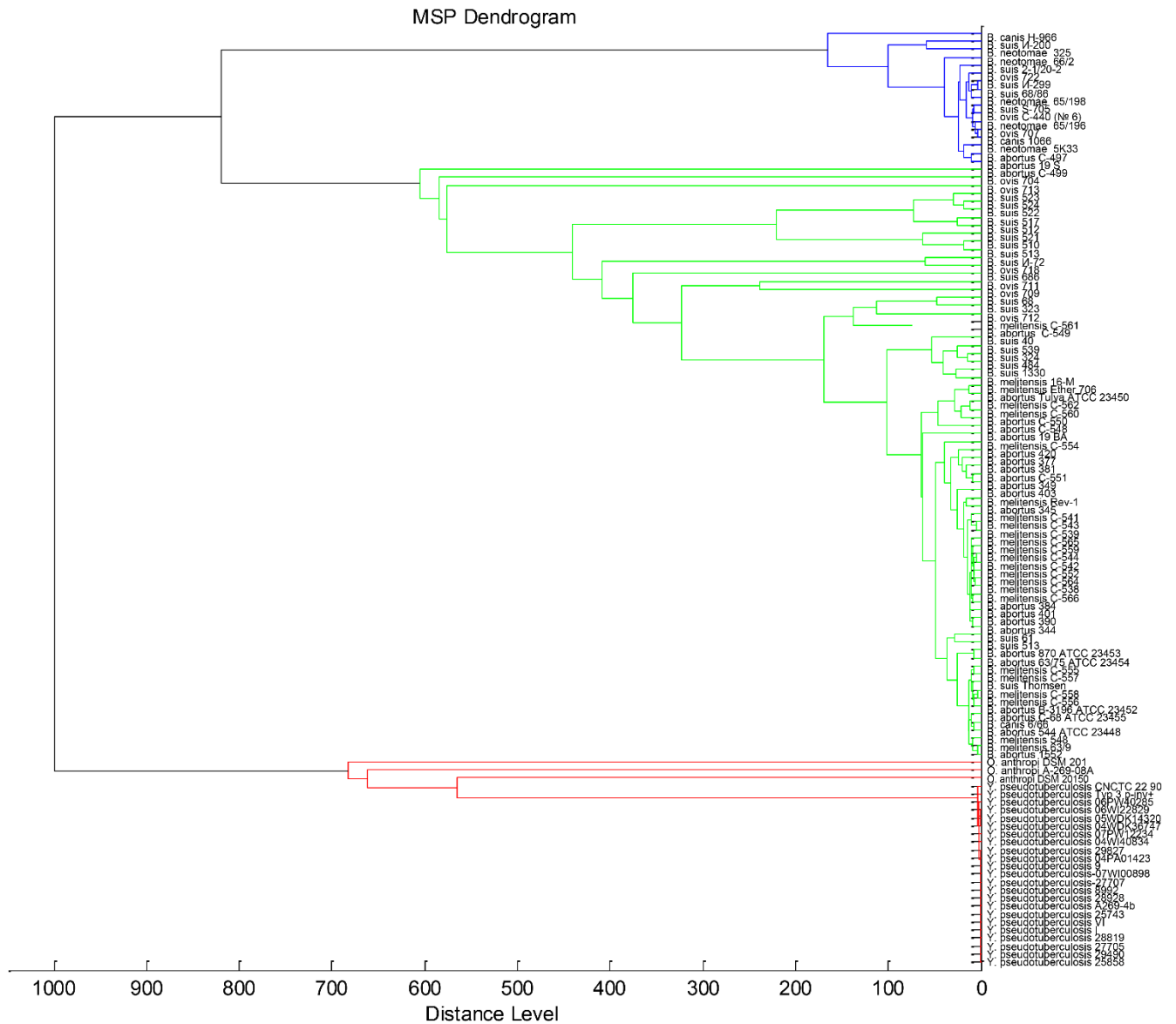


Рисунок 14 – MSP-дендрограмма, построена на основании кластерного анализа штаммов *Brucella* spp., *Y. pseudotuberculosis* и *Ochrobactrum* spp. с использованием данных MALDI-TOF MS

Установление совокупности уникальных сигналов, специфичных для всех бруцелл, а также для отдельных видов дают нам основание предположить, что при анализе культур методом MALDI-TOF MS выявление совокупности специфичных маркеров бруцелл позволит проводить не только идентификацию, но и типирование возбудителя бруцеллеза.

### 3.7 Заключение по главе 3

В ходе работы была проведена оптимизация и стандартизация методики обеззараживания и подготовки проб культур возбудителя бруцеллеза. Подтверждена эффективность предложенного способа обеззараживания бактериальных экстрактов культур возбудителя бруцеллеза 95 % спиртом, оптимизированы объемное соотношение матрица/образец, и значения чувствительности лазера при ионизации образца. Установлено, что применение агара Альбими в качестве питательной среды при подготовке образцов культур *Brucella* spp. для MALDI-TOF MS анализа является оптимальным, при этом удалось идентифицировать 17 пиков на спектрах в интервале масс 2 – 20 кДа, отличающихся по интенсивности, которая зависела от свойств питательной среды. Сформирован комплекс критериев для оценки качества референсных масс-спектров чистых культур возбудителя бруцеллеза: абсолютная интенсивность пиков  $I > 500$ , разрешение  $R > 150$ , общее число идентифицированных пиков от 65 до 100, отношение сигнал/шум – 15. С учетом оптимальных значений характеристик валидного масс-спектра отобраны белковые профили бруцелл разных видов, включенные в разработанную на платформе программы Biotyper DB Offline Classification базу данных, которая может быть использована совместно с коммерческой базой «Bruker Daltonics». На этой основе проведена идентификация до рода 100 % и до вида 97 % исследованных штаммов.

Проведена кластеризация представителей шести видов бруцелл, показано, что кластерный анализ штаммов *Brucella* spp. на основании данных MALDI-TOF MS и стандартного пакета программ MALDI BioTyper не позволяет проводить однозначную общепринятую межвидовую дифференциацию культур возбудителя, которая согласуется с соответствующими результатами молекулярно-генетических методов.

Апробированный анализ в среде языка программирования «R» масс-спектров, обуславливающих особенности признаков для бруцелл разных видов, позволил четко разделить три вида бруцелл, продемонстрировав эффективность применения этого способа биоинформационной обработки данных времяпролетной масс-спектрометрии белковых экстрактов культур в целях межвидовой дифференциации штаммов *Brucella* spp. Установлена совокупность уникальных сигналов, специфичных для представителей шести видов *Brucella* spp., а также для отдельных видов дал основание предположить, что при анализе культур методом MALDI-TOF MS выявление этой совокупности позволит проводить не только выявление но и типирование возбудителя бруцеллеза.

## ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА В ОБРАЗЦАХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

### 4.1 Оценка возможности детекции *Brucella* spp. в модельных клинических образцах методом MALDI-TOF MS

Известно, что благодаря фагоцитозу бактериальных клеток макрофагами крови, бруцеллы локализуются преимущественно в лейкоцитах. Поэтому нами была исследована возможность анализа фракции лейкоцитов в качестве образца для выявления возбудителя бруцеллеза методом времяпролетной масс-спектрометрии.

На данном этапе проводили оценку эффективности алгоритма выявления возбудителя бруцеллеза в искусственно контаминированных образцах крови с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Для реализации поставленной цели провели MALDI-TOF MS анализ белковых экстрактов проб крови человека, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза (модельные образцы крови), изучили эффективность разработанного нами алгоритма выявления бруцелл в модельных образцах крови, основанного на определении бруцелла-специфичных биомаркеров в белковых экстрактах с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Всего было исследовано 120 образцов, для каждого из которых получали не менее 30 масс-спектров с последующим формированием суммарного спектра образца. Наиболее репрезентативные спектры использовали для сравнительного анализа полученных данных.

В результате инкубации искусственно контаминированной бруцеллами крови в образце достигалась необходимая концентрация бактериальных клеток для проведения MALDI-TOF MS анализа. Конечная концентрация бактерий в крови составляла около  $1 \times 10^4$  м.к./мл.

На рисунке 21 представлена полученная в ходе настоящего исследования микрофотография, иллюстрирующая фагоцитоз бруцелл в мазке крови, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза.

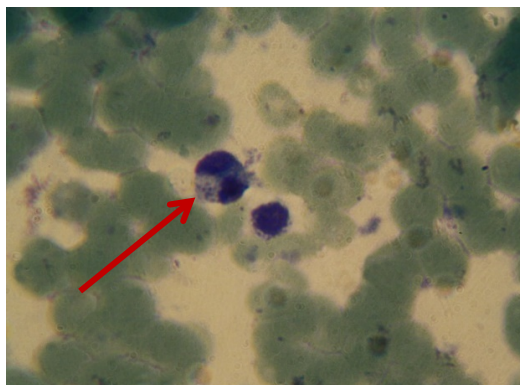


Рисунок 21 – Мазок крови, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза. Фагоцитоз бруцелл (стрелка). Окраска азуром-II,  $\times 1000$  (микроскоп Nikon Eclipse E200, Япония; окуляр – 10x (F.O.V. 20); объектив – 100 $\times$ 1,25)

При масс-спектрометрическом анализе модельных образцов крови, содержащих бруцеллы, Ferreira L. et al. предложил удалять в процессе пробоподготовки лейкоциты многократным центрифугированием и для последующего MALDI-TOF MS использовать полученный супернатант [71]. Учитывая внутриклеточную локализацию возбудителя бруцеллеза, по нашему мнению, целесообразно использовать в качестве образца для выявления микроорганизма белковый экстракт лейкоцитарной фракции крови. Для сравнительной оценки указанных вариантов пробоподготовки в ходе исследования параллельно проводили MALDI-TOF MS анализ супернатанта и лейкоцитарной фракции образцов модельных образцов крови. При этом было установлено, что пик-листы масс-спектров лейкоцитарной фракции, как правило, более представительны (в среднем на  $20 \pm 2\%$ ), что может быть связано с чрезвычайно низкой концентрацией клеток возбудителя в полученном после центрифугирования супернатанте. Кроме того, интенсивность родоспецифичных фрагментов бруцелл на 30 – 40 % превосходила аналогичные сигналы на масс-спектрах, полученных из сыворотки крови. Таким образом, использование белковых экстрактов лейкоцитарной фракции представляется более предпочтительным по сравнению с супернатантом при выявлении возбудителя бруцеллеза в крови методом MALDI-TOF MS.

Ранее нами был исследован комплекс параметров для оценки качества масс-спектров чистых культур возбудителя бруцеллеза. Учитывая особенности качественного и количественного состава сигналов масс-спектров экстрактов модельных образцов крови, а также экспериментальные данные, полученные в рамках настоящей работы, нами были приняты следующие параметры валидных масс-спектров: абсолютная

интенсивность пиков  $I > 300$ , разрешение  $R > 150$ , общее число идентифицированных пиков от 65 до 100, отношение сигнал/шум – 10/1.

Основное количество зарегистрированных пиков на масс-спектрах белковых экстрактов крови человека было локализовано в интервале значений масс 2300 – 16100 Да рабочей области и составило  $80 \pm 10$ . На всех масс-спектрах встречались гомологичные сигналы, отличающиеся по абсолютной интенсивности ( $m/Z \pm 5$  Да): 2581, 3268, 3352, 3372, 3440, 3467, 3486, 3508, 3613, 3711, 4230, 5226, 5290, 5422, 5674, 5935, 6345, 6576, 7090, 7353, 7570, 7935, 9414, 10088, 10442, 10830, 11100, 1688, 15131, 15866. Изменения количественных и качественных характеристик на масс-спектрах крови человека для указанных гомологичных сигналов составляли: интенсивность – от 314 до 9533 a.i., разрешение пиков – от 157 до 2141, отношение сигнал/шум – от 10/1 до 30/1, ширина пика на полувысоте – от 7 до 375. При этом установленные нами общие сигналы ( $m/Z \pm 5$  Да): 2581, 3268 – были обозначены ранее как потенциально специфичные для микроорганизмов рода *Brucella*. Кроме того, следует отметить, что наибольшая относительная интенсивность на всех спектрах была характерна для фрагментов ( $m/Z \pm 5$  Да): 3372, 3440, 3486, 5674, 6345, 7090, 7935. В то же время масс-спектры отдельных образцов содержали единичные сигналы ( $m/Z \pm 5$  Да): 3533, 4062, 4593, 5156, 8123, 10031, что может быть следствием присутствия в исследуемом экстракте переменных белковых фрагментов. Полученные данные масс-спектрометрического анализа белковых экстрактов крови условно здоровых людей были использованы при формировании супер-спектра отрицательного контроля.

Результаты подтверждают, что состав протеома крови человека динамичен и может изменяться в зависимости от текущих условий жизнедеятельности и состояния здоровья. Помимо присутствующих различий протеомного профиля крови у разных индивидуумов и его естественных изменений во времени, существуют вариации количественного и качественного набора белков, связанные с адаптивным ответом на изменение внешних условий. Также известно, что на белковый состав крови могут оказывать влияние различные факторы, в том числе питание, физическая активность, хронические заболевания. Следовательно, возможные изменения белкового состава крови у различных индивидуумов будут сопровождаться появлением или элиминированием некоторых белков,  $m/Z$  которых может совпасть с таковыми у бруцелл. В связи с этим, при выявлении возбудителя бруцеллеза в клинических образцах, а также в крови методом

MALDI-TOF MS важно учитывать вариабельность белкового состава исследуемого биоматериала (рисунок 22).

Таким образом, MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ экстрактов крови человека позволил выявить неспецифичные маркеры ( $m/Z \pm 5$  Да): 2581, 3268, ранее используемые при родовой идентификации культур возбудителя бруцеллеза. Для выявления бруцелл в модельных и клинических образцах крови нами предложена схема анализа, включающая поиск 15 специфичных фрагментов на соответствующих масс-спектрах ( $m/Z \pm 5$  Да): 2422, 3025, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068. Следовательно, на основании присутствия всех 15 аналитически значимых сигналов на соответствующем спектре можно судить о наличии бруцелл в исследуемом образце.

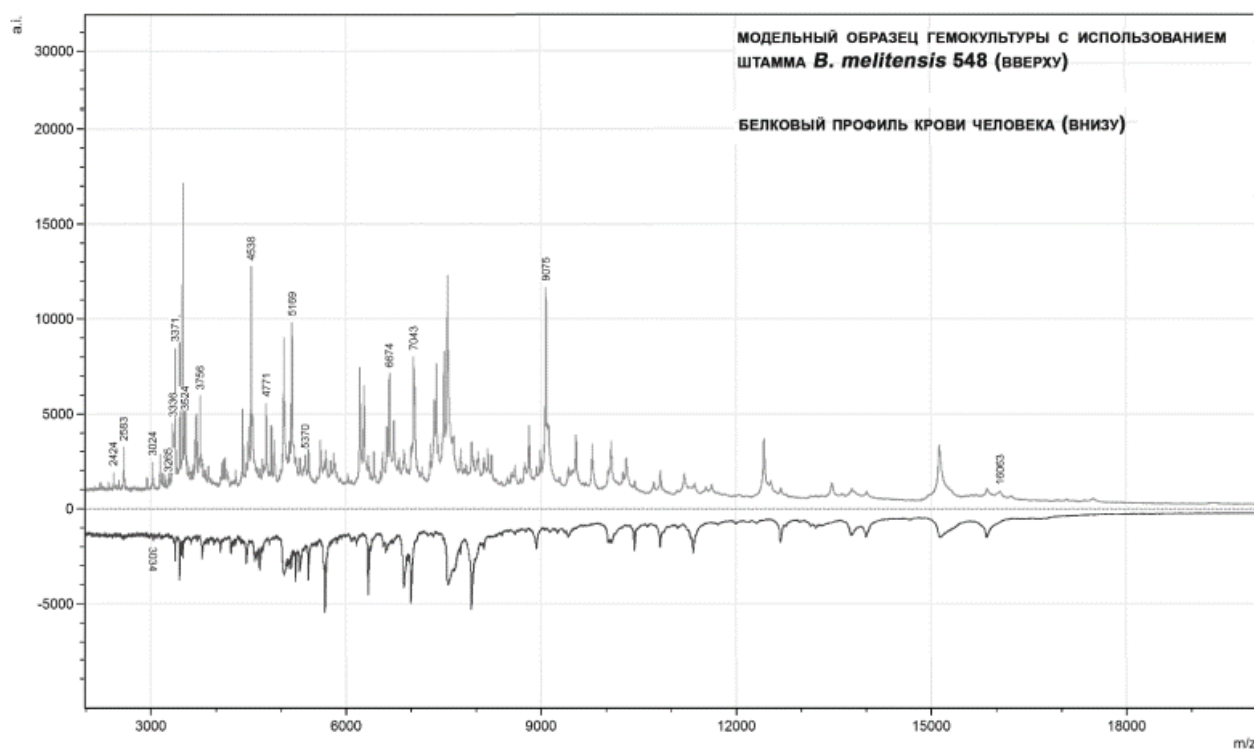


Рисунок 22 – Типичный MALDI-TOF масс-спектр экстракта крови человека, искусственно контаминированной культурой *B. melitensis* 548 (вверху) в сравнении с белковым профилем интактной крови (внизу)

На следующем этапе работы был осуществлен MALDI-TOF MS анализ экстрактов модельных образцов крови. При этом было определено, что основное количество зарегистрированных сигналов на масс-спектрах экстрактов образцов контаминированной возбудителем бруцеллеза крови человека локализуется в интервале значений масс 2300 –

16100 Да и составляет  $80 \pm 10$ . Белковые профили всех исследуемых модельных образцов гемокультур содержали общие сигналы ( $m/Z \pm 5$  Да): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3372, 3440, 3467, 3523, 3696, 3754, 4410, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6217, 6284, 6345, 6672, 7048, 7394, 7513, 7567, 7765, 7938, 9085, 15129, 16068. При этом интенсивность указанных фрагментов находилась в диапазоне от 2022 до 19541 a.i., разрешение – от 292 до 629, отношение сигнал/шум – от 10/1 до 21/1, ширина пика на полувысоте – от 7 до 52.

Кроме того, был установлен ряд особенностей белковых профилей экстрактов модельных образцов крови относительно отрицательного контроля. В частности, на масс-спектрах экстрактов крови, содержащей культуры *B. abortus* 544, *B. abortus* C-68, *B. abortus* 63-75, *B. abortus* B-3196, *B. abortus* Tulya и *B. abortus* C-548, интенсивность фрагментов ( $m/Z \pm 5$  Да): 5226, 5290, 5422, 5674, 7353, 7565 в 3 – 5 раз превосходила интенсивность аналогичных сигналов интактной крови. Вероятно, это связано с интерференцией сигналов, присутствующих в модельных системах, сходных по массе белков, которые содержатся в бактериальных экстрактах бруцелл и в крови человека. В то же время, было отмечено существенное снижение интенсивности (в 10 и более раз) сигналов ( $m/Z \pm 5$  Да): 3372, 3440, 3467 на профилях модельных образцов крови, по сравнению с сигналами на масс-спектрах экстрактов интактной крови. Полученные данные могут свидетельствовать о возможном взаимодействии белков крови в модельных образцах с последующим удалением образовавшихся комплексов в процессе пробоподготовки. В то же время, для общих сигналов ( $m/Z \pm 5$  Да): 6345, 7765, 7938 – существенных изменений параметров не наблюдалось.

На масс-спектрах экстракта модельного образца крови, содержащей *B. abortus* 19 ВА, была отмечена группа достоверно воспроизводимых сигналов, отсутствующих на белковых профилях интактной крови ( $m/Z \pm 5$  Да): 2202, 2224, 2291, 2305, 2319, **2422**, 2531, **2581**, 2635, 2729, 2848, 2876, 2894, 2943, 2995, **3025**, 3189, 3224, **3268**, **3336**, 3428, 3475, **3523**, **3696**, 3823, 3997, **3754**, 4258, **4545**, 4658, 4723, 4756, **4770**, 4897, 4925, **5036**, **5170**, 5534, 5580, 5611, 5749, 6123, 6286, 6314, **6672**, 6922, **7048**, 7591, 7794, 7853, 7881, 7908, 7966, 7995, 8022, 8048, 8341, **9085**, 9302, 10065, 10738, 11358, 12627, 15184, 15899.

Таким образом, нами было подтверждено сохранение выявленного ранее комплекса специфичных для *Brucella* spp. сигналов в экстрактах модельных образцов крови. Кроме того, в указанной совокупности помимо 15 родоспецифичных сигналов

бруцелл (выделены курсивом) присутствовали дополнительные фрагменты, характерные только для модельных образцов крови. Полученные спектральные характеристики экстрактов модельных образцов крови подтверждают предположение о том, что присутствие возбудителя бруцеллеза в значительной мере меняет белковый профиль крови в исследуемом диапазоне.

Наряду с этим, на масс-спектрах экстрактов модельных образцов крови были выявлены сигналы, отсутствующие на соответствующих профилях интактной крови человека и культур возбудителя бруцеллеза. Например, для модельных образцов крови, содержащих *B. abortus* 19 ВА, комплекс указанных сигналов включал ( $m/Z \pm 5$  Да): 2202, 2319, 2531, 2635, 2848, 2876, 3428, 3823, 3997, 4658, 4723, 4897, 4925, 5580, 5611, 5749, 6123, 6286, 7591, 7794, 7853, 7881, 7908, 7966, 7995, 8022, 8048, 8341, 9302, 10065, 10738, 11358, 12627, 15184, 15899. Для масс-спектров экстрактов модельных образцов крови, содержащих *B. melitensis* 548, выявленная группа специфичных сигналов составила ( $m/Z \pm 5$  Да): 2202, 2291, 2319, 2395, 2635, 2876, 2996, 3197, 3985, 4154, 4258, 4658, 4723, 5021, 5253, 5344, 5462, 5749, 6123, 6862, 7462, 7966, 8048, 8311, 8569, 8649, 8873, 8970, 9290, 10040, 10738, 11072, 11325, 15789, 16114, 16172, 16222, 16336, 16635, 16719.

Полученные результаты позволяют наглядно продемонстрировать изменение качественных характеристик белкового профиля крови человека в присутствии комплекса белков возбудителя бруцеллеза. Мы полагаем, что указанные фрагменты могут быть использованы в качестве диагностических маркеров при MALDI-TOF MS исследовании клинического материала, подозрительного на наличие возбудителя бруцеллеза наряду с ранее изученными родоспецифичными сигналами.

Таким образом, при сопоставлении полученных масс-спектрометрических данных нами охарактеризован комплекс сигналов, позволяющий достоверно дифференцировать кровь условно здорового человека и контаминированную возбудителем бруцеллеза.

#### **4.2 MALDI-TOF MS анализ белковых профилей экстрактов крови**

С целью совершенствования алгоритма применения MALDI-TOF MS для прямого выявления возбудителя бруцеллеза в биоматериале нами были изучены профили белковых экстрактов крови биопробных животных, зараженных патогенными штаммами бруцелл.



Учитывая внутриклеточную локализацию возбудителя бруцеллеза, в качестве образца для белкового профилирования использовали экстракт лейкоцитарной фракции крови. Оценку особенностей белковых профилей экстрактов крови мышей, инфицированных бруцеллами, проводили при сравнении с масс-спектрами отрицательного контроля (кровь мышей из контрольной группы). Каждый образец анализировали в четырех повторах.

По результатам качественного и количественного анализа данных наиболее представительные спектры ( $79 \pm 3$ ) были получены для образцов крови мышей, которым вводили *B. abortus* 544 (рисунок 23).

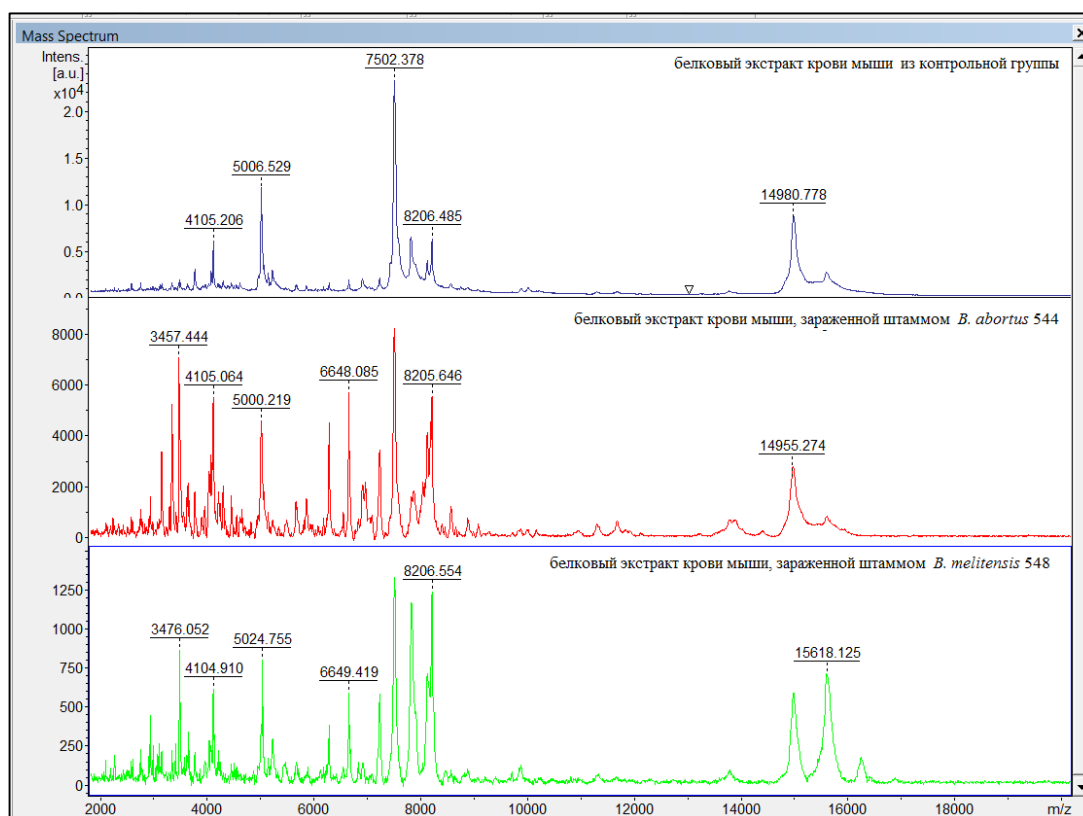


Рисунок 23 – Фрагменты масс-спектров экстрактов крови мышей, зараженных культурами *B. abortus* 544 (1), *B. melitensis* 548 (2) и из группы сравнения (3)

На масс-спектрах белковых экстрактов крови мышей из группы сравнения основное число сигналов было локализовано в двух областях значений масс рабочей области: 2,6–8,5 и 13,5–16,0 кДа. В результате сравнительного анализа белковых профилей образцов отрицательного контроля были установлены общие фрагменты, значения абсолютной интенсивности которых варьировало в диапазоне от 250 до  $2,0 \times 10^4$  a.i. ( $m/Z \pm 5$  Да): 2683, 2739, 2925, 3140, 3327, 4195, 4286, 5005, 5660, 6908, 7228, 7506, 11682, 14992, 15001.

Разрешение для перечисленных сигналов находилось в диапазоне от 205 до 436, отношение сигнал/шум – от 6/1 до 19/1, ширина пика на полувысоте – от 11 до 52, частота регистрации составляла  $\geq 0,99$ . Указанные значения параметров полученных масс-спектров являются приемлемыми для дифференциации аналитически значимых фрагментов из всего массива сигналов. При этом, области  $m/Z$  содержащие сигналы, в том числе с высоким значением абсолютной интенсивности, перекрывались с областями значений масс, в которых регистрируются специфичные для представителей рода *Brucella* пики, что, вероятно, может затруднить выявление бруцеллоспецифичных сигналов на масс-спектрах экстрактов крови мышей, зараженных возбудителем бруцеллеза.

Основное количество зарегистрированных пиков на масс-спектрах белковых экстрактов крови мышей, зараженных возбудителем бруцеллеза, было расположено в интервале значений масс 2,0 – 8,3 и 14,5-1,6 кДа рабочей области.

В ходе сравнительного анализа MALDI-TOF масс-спектров белковых экстрактов лейкоцитов крови инфицированных животных всех групп были выявлены общие пики ( $m/Z \pm 5$  Да): 2250, **2581**, **3025**, 3640, **3696**, **3754**, **4545**, **6672**, 7905, 8351, 14504 (курсивом отмечены родоспецифичные маркеры возбудителя бруцеллеза). Интенсивность указанных сигналов находилась в диапазоне от 300 до 6000 a.i., разрешение – от 269 до 534, отношение сигнал/шум – от 8/1 до 24/1, ширина пика на полувысоте – от 6 до 59. Указанные параметры общих сигналов позволяют достоверно дифференцировать их от остальной группы пиков. Частота регистрации шести родоспецифичных маркеров бруцелл, отличающихся по абсолютной интенсивности, составила 0,98.

В ходе сравнительного анализа белковых профилей экстрактов лейкоцитов крови мышей, инфицированных культурой *B. abortus* 544, были установлены специфичные для этой группы сигналы ( $m/Z \pm 5$  Да): 2322, 2334, 4941, 6257, 10781, 10798, 11000, 12117, 13609. На масс-спектрах белковых экстрактов лейкоцитов крови животных, зараженных *B. melitensis* 548, было выявлено 2 общих сигнала ( $m/Z \pm 5$  Да): 2264, 8378. Белковые профили экстрактов крови мышей 3 группы (*B. suis* 1330) также включали общие уникальные пики ( $m/Z \pm 5$  Да): 7106, 14467, 15000. Можно заключить, что инфицирование модельных животных возбудителем бруцеллеза разных видов сопровождается изменением соответствующих белковых профилей экстрактов крови, что в свою очередь, приводит к появлению специфичных сигналов.

Визуализация данных, построенная методом PCA с использованием ресурсов статистического программного обеспечения «Mass-Up» (рисунок 24) отражает распределение проб крови искусственно инфицированных животных компактно и дискретно от крови мышей из группы сравнения.

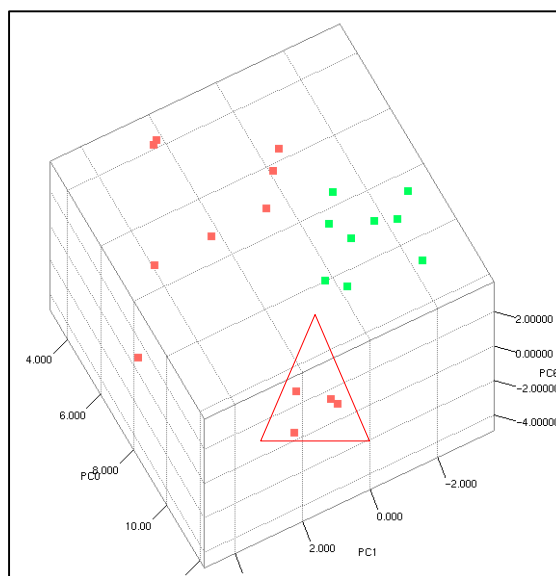


Рисунок 24 – Диаграмма распределения крови мышей, зараженных культурами *B. abortus* 544, *B. melitensis* 548 (красные маркеры) и *B. suis* 1330 (красные маркеры в треугольнике) и из группы сравнения (зеленые маркеры) на основании результатов анализа MS профилей методом PCA

На диаграмме можно отметить явное разделение образцов крови мышей при острой форме бруцеллеза на две группы: первую образуют животные, зараженные культурами *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 548; во вторую вошли животные, инфицированные *B. suis* 1330. Следовательно, распределение образцов на основании MS данных полностью совпадает с видовой принадлежностью используемых при заражении штаммов, что, вероятно, может быть следствием избыточной концентрации патогена, используемой при заражении, а также последующей персистенцией возбудителя в организме биопробного животного в течение продолжительного времени.

Формирование отдельного кластера образцами лейкоцитарной фракции крови животных, зараженных *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 548 на дендрограмме (рисунок 25), в полной мере согласуется с общеизвестными данными о генетической близости представителей, указанных двух видов бруцелл и с результатами на основании анализа сходства белковых профилей их культур. Образцы отрицательного контроля формировали

отдельную группу. Пробы крови животных, зараженных культурами *B. suis* 1330, также формировали компактную группу, по сравнению с образцами крови мышей, зараженных культурами *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 548. Возможно, подобное расположение является следствием того, что белковые профили проб лейкоцитов крови животных, зараженных культурами *B. suis* 1330, характеризовались наименьшей представительностью (количество и интенсивность сигналов) по сравнению с образцами от животных, зараженных *B. abortus* 544, *B. melitensis* 548.

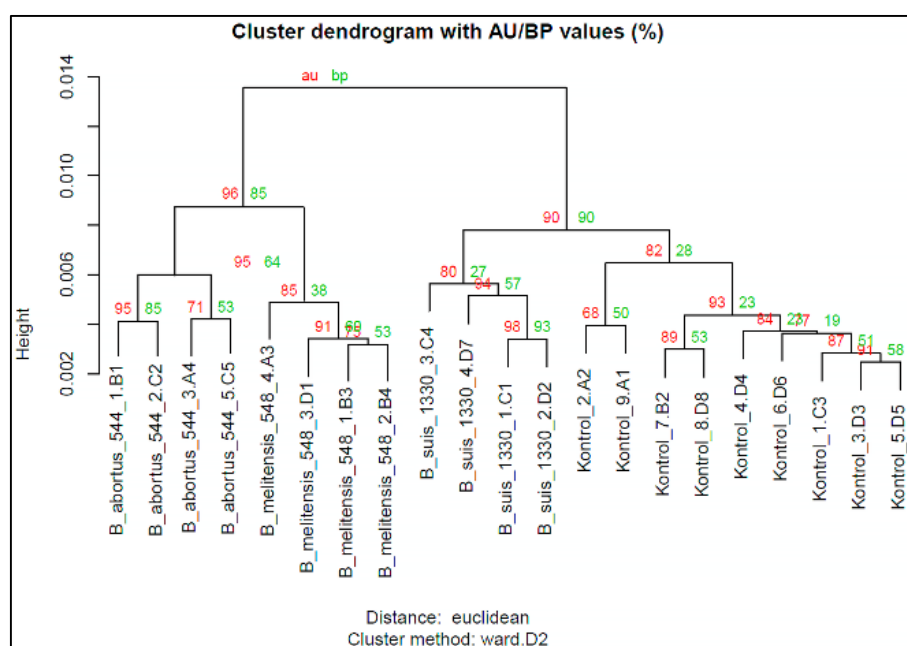


Рисунок 25 – Дендрограмма масс-спектров проб крови мышей из групп сравнения

В ходе работы нами была подтверждена возможность выявления специфичных маркеров возбудителя бруцеллеза в биоматериале методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце на стадии пробоподготовки. Из 17 специфичных для представителей рода *Brucella* фрагментов, на масс-спектрах экстрактов крови, искусственно зараженных животных, нами было зарегистрировано только 6, что, предположительно, связано с присутствием белков, близких по значению  $m/Z$  в исследуемом диапазоне масс. В то же время, при сравнении с результатами анализа модельных клинических образцов методом времяпролетной масс-спектрометрии (см. главу 4.1), заметное сокращение количества маркеров, характеризующих возбудителя бруцеллеза, может быть обусловлено иммунологической реактивностью организма больного животного.

На основании данных сравнительного анализа всех белковых профилей экстрактов лейкоцитов крови животных при остром бруцеллезе установлено присутствие 11 общих фрагментов ( $m/Z \pm 5$  Да): 2250, **2581**, **3025**, 3640, **3696**, **3754**, **4545**, **6672**, 7905, 8351, 14504 (курсивом отмечены родоспецифичные маркеры возбудителя бруцеллеза). Очевидно, что остальные 5 общих пиков могут быть ассоциированы с протеканием воспалительного процесса в организме инфицированного бруцеллезом животного.

Присутствие различий на белковых профилях экстрактов лейкоцитов крови мышей, инфицированных культурами возбудителя бруцеллеза, очевидно, обусловлено не только индивидуальными особенностями используемых культур бруцелл разных видов, но и их адаптивными изменениями в организме животных в условиях персистенции возбудителя. Следовательно, при нахождении в организме хозяина возбудитель инфекции подвергается воздействию иммунной системы, что, вероятно, обуславливает синтез патогеном определенных белков, экспрессия которых вне организма хозяина отсутствует.

Выявленные уникальные фрагменты, присутствующие на масс-спектрах экстрактов лейкоцитов крови при остром бруцеллезе, могут быть использованы при разработке эффективного методического подхода для прямого выявления и идентификации возбудителя бруцеллеза в крови с использованием MALDI-TOF MS.

Таким образом, результаты экспериментального исследования позволяют говорить о высокой диагностической информативности метода MALDI-TOF MS для прямого выявления белковых маркеров бруцелл в биоматериале и последующего определения их видовой принадлежности, что требует дальнейших исследований. Впервые охарактеризованы ассоциированные с бруцеллезной инфекцией 11 белковых маркеров, в том числе 6 – специфичных для микроорганизмов рода *Brucella* spp., которые могут быть использованы при разработке эффективного методического подхода для диагностики бруцеллеза методом MALDI-TOF MS.

#### **4.3 Оценка возможности применения времяпролетной масс-спектрометрии для анализа клинического материала**

Выявление особенностей белковых профилей крови больных бруцеллезом проводили путем сравнительного анализа их со спектрами экстрактов крови условно здоровых людей и штаммов бруцелл. Типичные масс-спектры представлены на

рисунке 26. На всех масс-спектрах экстрактов крови больных бруцеллезом выявлены уникальные отличающиеся по интенсивности общие пики ( $m/Z \pm 5$  Да): 2085, **3268**, **3336**, 4025, 4124, 4156, 4252, 4516, **5360**, 5558, **6672**, 7147, 7566, 8311, 9824, 10039, 15132, 15873 (курсивом отмечены специфичные для *Brucella* spp.).

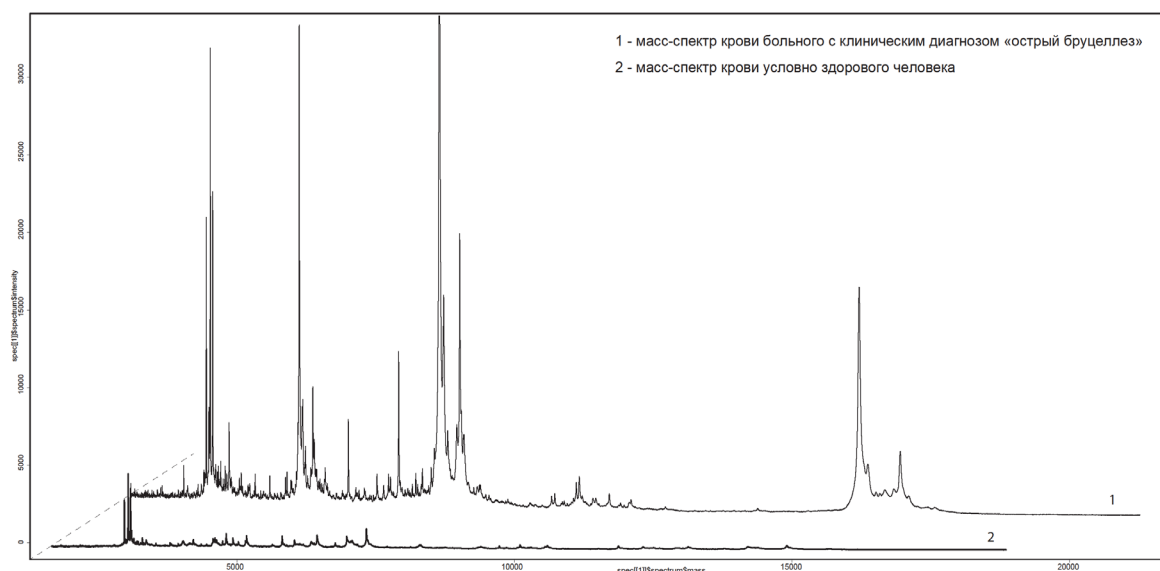


Рисунок 26 – Масс-спектрометрические профили белковых экстрактов крови больного бруцеллезом (1) и условно здорового человека (2)

В то же время, были отмечены сигналы, которые присутствовали только у 90 % образцов ( $m/Z \pm 5$  Да): 2014, **2422**, 4156, 5499, 5940, 6860, **7048**, 7885. Остальные два сигнала **3696** и **4914** Да были выявлены лишь для 80 % масс-спектров проб крови больных бруцеллезом.

На основании сравнительного анализа белковых профилей больных бруцеллезом людей была выявлена совокупность отсутствующих на масс-спектрах контрольной группы аналитически значимых сигналов ( $m/Z \pm 5$  Да): 2014, 2085, **2422**, **3268**, **3336**, **3696**, 4025, 4124, 4156, 4252, 4516, 4914, **5360**, 5499, 5558, 5940, **6672**, 6860, **7048**, 7147, 7566, 7885, 8311, 9824, 10039, 15132, 15873, курсивом отмечены родоспецифичные для бруцелл (рисунок 27). Частота встречаемости комплекса из всех 7 сигналов в масс-спектрах экстрактов крови больных бруцеллезом составила 72,2 %, в то время как пик-листы остальных масс-спектров соответствующих образцов содержали 6 из 7 описанных фрагментов в разных сочетаниях. Другие 20 из отмеченных общих сигналов нехарактерны для белковых профилей условно здоровых людей и масс-спектров культур *Brucella* spp. Очевидно, эти фрагменты неспецифичны и могут быть ассоциированы в

первую очередь с протеканием острых иммуно-воспалительных процессов в организме больного бруцеллезом.

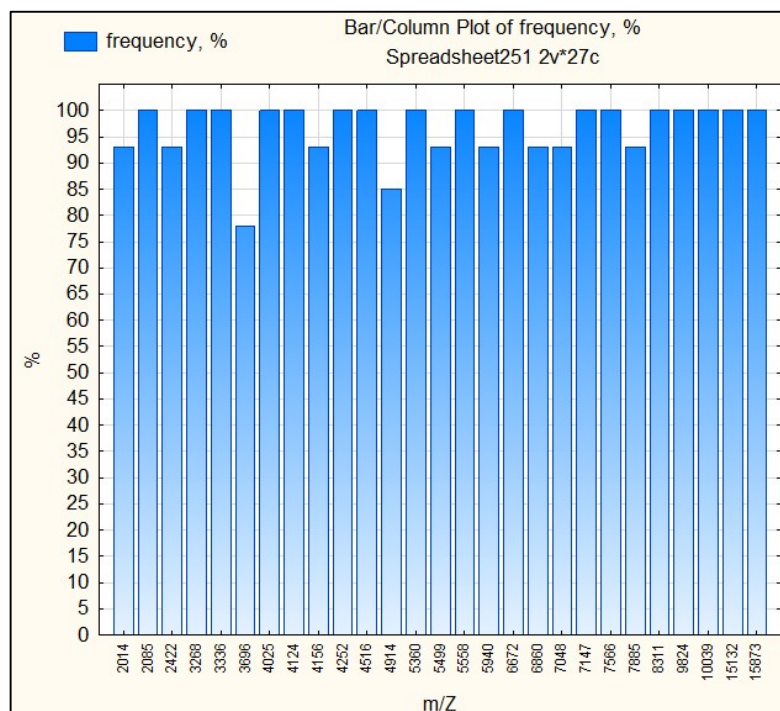


Рисунок 27 – Диаграмма частоты выявления пиков, общих для масс-спектров экстрактов крови больных бруцеллезом (ось x – m/Z сигнала, ось y – % присутствия пика на масс-спектрах всех образцов)

Для каждого из указанных сигналов на масс-спектрах образцов клинического материала отмечалось существенное изменение количественных характеристик. Максимальная интенсивность была зарегистрирована для сигналов ( $m/Z \pm 5$  Да): 7566 ( $24730 \pm 20247$  a.i.) и 15132 ( $9432 \pm 5380$  a.i.). Интенсивность остальных фрагментов изменялась в относительно узком диапазоне ( $2500 \pm 2000$  a.i.). Вместе с тем, интенсивность специфичных для микроорганизмов *Brucella* spp. фрагментов изменялась в следующем диапазоне ( $m/Z \pm 5$  Да): 2422 (от 278 до 3668 a.i.), 3268 (от 1101 до 8272 a.i.), 3336 (от 597 до 13140 a.i.), 3696 (от 333 до 3895 a.i.), 5360 (от 322 до 3192 a.i.), 6672 (от 275 до 2517 a.i.), 7048 (от 251 до 1993 a.i.). Наибольшие значения отношения сигнал/шум отмечены для следующих сигналов ( $m/Z \pm 5$  Да): 3268 ( $23 \pm 19$ ), 4516 ( $19 \pm 10$ ) и 7566 ( $12 \pm 5$ ). Разрешение пиков (R) для общих сигналов на масс-спектрах экстрактов крови больных бруцеллезом находилось в диапазоне  $451 \pm 50$ . Характеристики указанных сигналов, возможно, коррелируют с концентрацией возбудителя в крови больного бруцеллезом. Однако при высокой вариабельности параметров основных сигналов, во всех клинических образцах больных с установленным диагнозом острый бруцеллез были

выявлены фрагменты, родоспецифичные для микроорганизмов рода *Brucella* (получен положительный результат).

Комплекс из общих сигналов, из которых 7 являются специфичными для представителей *Brucella* spp. ( $m/Z \pm 5$  Да): 2422, 3268, 3336, 3696, 5360, 6672, 7048, позволяет точно дифференцировать масс-спектры условно здоровых людей от больных бруцеллезом без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце.

При сопоставлении данных, полученных с помощью регламентированных методов диагностики (ПЦР, бактериологический метод) и MALDI-TOF MS анализа проб крови больных бруцеллезом людей, ни для одного из исследованных образцов не был получен положительный результат всеми тремя методами [отчет о работе Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза <http://www.snipchi.ru/updoc/2018/Bruzellez-2017.pdf>]. Применение бактериологического метода позволило выделить культуры бруцелл в 23 % от общего количества образцов, наличие ДНК возбудителя бруцеллеза методом ПЦР установлено в 66,7 % проб.

На основании данных статистического анализа для вероятности 0,95 чувствительность метода прямой детекции бруцелл в крови больных бруцеллезом людей методом MALDI-TOF MS составляла 90,48 %, специфичность – 96,3 %, точность – 94,67 %) ([http://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](http://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)). Кроме того, величина PPV, определяющая вероятность того, что заболевание присутствует, когда тест положительный, составляла 90,48 %. Показатель вероятности отсутствия заболевания при отрицательном тесте NPV был равен 96,30 %. Представленные результаты позволяют сделать заключение о том, что дискриминирующего разрешения метода времяпролетной масс-спектрометрии достаточно для достоверной детекции возбудителя бруцеллеза непосредственно в крови.

Таким образом, полученные в ходе исследования результаты подтверждают возможность выявления специфичных маркеров возбудителя бруцеллеза в крови больных людей с клиническим диагнозом острый бруцеллез методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце на стадии пробоподготовки.



#### 4.4 Биоинформационный анализ масс-спектров белковых экстрактов проб крови, потенциально содержащей возбудитель бруцеллеза

Биоинформационная обработка данных является необходимым этапом любого, в том числе и масс-спектрометрического исследования, от качества которой зависит достоверность полученных результатов.

Известно, что сигналы, регистрируемые на масс-спектрах бактериальных экстрактов в условиях низких значений pH, как правило, принято ассоциировать с консервативными рибосомальными белками, которые могут быть использованы в качестве маркеров для идентификации патогенных микроорганизмов в исследуемом образце.

Представленная нами схема биоинформационного анализа (рисунок 28), с применением программных пакетов в среде языка статистического программирования R, была успешно использована для масс-спектрометрических данных при дифференциации проб крови больных бруцеллезом от здоровых людей.

На начальном этапе спектры подвергали выравниванию, а соответствующие им значения интенсивностей масс-спектрометрических пиков – нормализации, путем деления интенсивности каждого масс-спектрометрического пика на сумму интенсивностей всех детектируемых в масс-спектре пиков. Выравнивание необходимо для соотнесения между собой пиков одних и тех же белков в разных спектрах. Необходимость в данной процедуре обусловлена присутствующей погрешностью в измерении масс веществ [47].



Рисунок 28 – Алгоритм биоинформационного анализа MALDI-TOF масс-спектров

Поскольку информацию о концентрации белка определяют интенсивностью соответствующего ему пика в масс-спектре, для этого выявляли на масс-спектрах

несимметричные пики и пики с низкой интенсивностью (менее 500 a.i.). Интенсивность пиков корректировали с использованием фильтра sqrt (square root transformation, метод квадратного корня дисперсии), применение которого не влечет «завышения» базовой линии.

Для сглаживания максимумов локальных пиков на спектрах и снижения уровня шума без значительных искажений в площадях пиков использовали метод Савицкого-Голея [129], для чего вводили дополнительный аргумент (`type = b`) и находили пороговое значение нормализации интенсивности для двух крайних точек в интервалах 2000-3000 и 9000-10000 Да (в данном примере) с учетом разного дрейфа по шкале  $m/Z$  для указанных областей.

Устранение фоновых шумов базовой линии, вызванных, в том числе присутствием в образце молекул матрицы, проводили с использованием алгоритма SNIP (Non-linear Iterative Peak-clipping algorithm), который позволяет сохранить максимумы интенсивности целевых пиков. Для этого использовали код с циклом в 100 «итераций» (повторов) с шагом 25. Экспериментально было установлено, что к корректному устранению фонового шума с сохранением максимумов локальных пиков приводит количество итераций 25, которое и было применено ко всему массиву масс-спектрометрических данных.

При использовании функции «выравнивание/деформация» значений  $m/Z$  сигналов для величин «tolerance» и «halfWindowSize» указывали значения 0,02 и 25 соответственно.

Таким образом, при выравнивании значения  $m/Z$  для гомологичных сигналов на разных спектрах удаляли пики, частота встречаемости которых составляла менее 25 %.

В качестве заключительного этапа предварительной обработки полученных данных формировали матрицу признаков «featureMatrix», отражающую зависимость функции  $m/Z$  от a.i. с соответствующими идентификаторами образцов.

Дифференцирование образцов экспериментальной группы измерений от образцов контрольной группы на основании выявления аналитически значимых сигналов осуществляли с помощью линейного дискриминантного анализа Фишера (LDA) – диагональный дискриминантный анализ (DDA), реализованного в пакете «sda», с предположением, что корреляция между признаками (пиками) пренебрежимо мала.

В результате анализа исследованные MS данные были распределены на две группы: отрицательный контроль (масс-спектры условно здоровых людей: не больных, не переболевших бруцеллезом и не вакцинированных против этой инфекции) и экспериментальная группа (масс-спектры крови больных бруцеллезом людей). Наибольший вклад в дифференциацию масс-спектров двух групп внесли маркеры ( $m/Z \pm 5$  Да): 2014, 3268, 4914, 5940, 6672, 7566. Наименьшее влияние на классификацию объектов по группам оказали пики ( $m/Z (\pm 5$  Да): 2422, 4124, 4156, 5360, 5499, 7885, 8311

Оценку значений расстояния между сформированными группами проводили по данным кластерного анализа, представленного на рисунке 29. Образование объектами двух отдельных ветвей, полученное по результатам проведенной кластеризации, считали статистически достоверным, поскольку значение бутстреп-вероятности AU для каждой превышала 80 %.

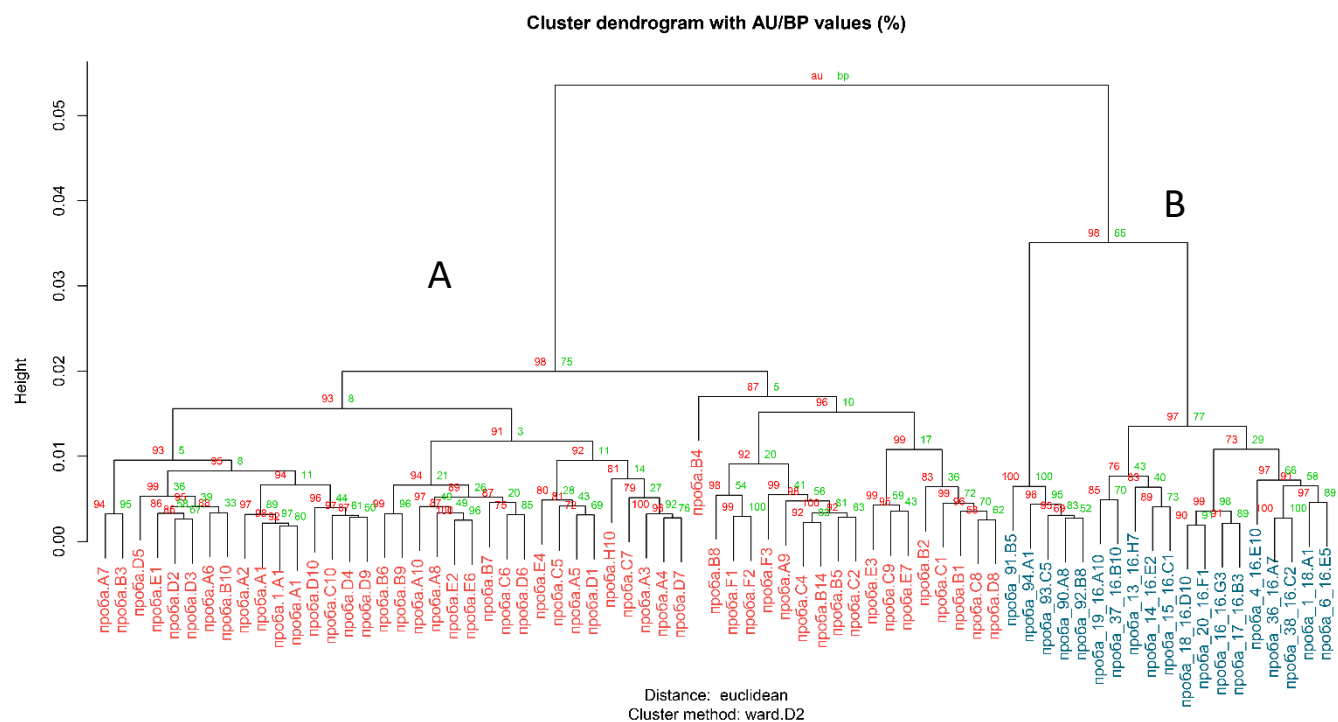


Рисунок 29 – Распределение образцов крови условно здоровых (ветвь А) и больных бруцеллезом людей (ветвь В) на основании данных MALDI-TOF MS

Полученные результаты позволяют наглядно подтвердить, что белковые профили условно здоровых и больных бруцеллезом людей отличаются по ряду качественных и количественных характеристик. Кроме того, эти различия могут быть успешно выявлены методом времяпролетной масс-спектрометрии, наиболее удобным подходом для обработки и интерпретации данных которой является метод главных компонент с

возможностью наглядного представления результатов анализа в формате кластера или дендрограммы.

На данном этапе был разработан биоинформационный анализ данных MALDI-TOF MS с помощью среды языка программирования «R», который позволяет дифференцировать образцы крови больных бруцеллезом от условно здоровых людей. Предлагаемый подход к интерпретации данных обеспечивает два наиболее важных, на наш взгляд, критерия качества классифицирования анализируемых объектов: компактность групп и их дискретность.

Таким образом, использование методики пробоподготовки крови, подозрительной на инфицирование бруцеллами в сочетании с разработанным нами биоинформационным подходом к анализу MALDI-TOF MS данных в среде языка программирования «R», позволяет выявлять совокупность общих сигналов, присутствие которых было установлено только на белковых профилях образцов крови больных бруцеллезом людей. Выявленные сигналы могут быть использованы в качестве диагностических маркеров при MALDI-TOF MS исследовании клинического материала, подозрительного на наличие возбудителя бруцеллеза.

#### **4.5 Заключение по главе 4**

В результате проведенных исследований разработана схема детекции бруцелл в образцах биологического происхождения с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии. Экспериментально подтверждена возможность детекции возбудителя бруцеллеза в модельных клинических образцах при сопоставлении масс-спектров чистых проб крови и проб, искусственно контаминированных бруцеллами. Охарактеризован комплекс сигналов, позволяющий достоверно дифференцировать пробы, искусственно контаминированные возбудителем бруцеллеза, показано, что использование белковых экстрактов лейкоцитарной фракции представляется более предпочтительным по сравнению с супернатантом при детекции патогена в крови методом MALDI-TOF MS.

Получение результатов MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа белковых профилей экстрактов крови при экспериментальном бруцеллезе дало основание говорить о высокой диагностической информативности метода при прямом выявлении белковых маркеров бруцелл в биоматериале и последующего определения их видовой

принадлежности. Кроме того, была охарактеризована ассоциированная с бруцеллезной инфекцией совокупность белковых маркеров, которые могут быть использованы при разработке эффективного методического подхода для диагностики бруцеллеза методом MALDI-TOF MS.

На следующем этапе была проведена оценка возможности применения времяпролетной масс-спектрометрии для анализа клинического материала. На основании сравнительного анализа масс-спектров проб крови больных бруцеллезом людей установлена совокупность отсутствующих на масс-спектрах контрольной группы аналитически значимых сигналов и среди них 7 родоспецифичных для бруцелл. Данный комплекс сигналов позволяет точно дифференцировать масс-спектры больных бруцеллезом людей от спектров здоровых без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце. На основании данных статистического анализа для вероятности 0,95 чувствительность метода прямой детекции бруцелл в крови больных бруцеллезом людей методом MALDI-TOF MS составляла 90,48 %, специфичность – 96,3 %, точность – 94,67 %). Результаты исследования подтверждают возможность выявления специфичных биомаркеров возбудителя бруцеллеза непосредственно в крови больных бруцеллезом.

Полученные в ходе настоящего исследования результаты обусловили возможность разработки схемы биоинформационного анализа, состоящей из последовательно выполняемых этапов: контроля качества и нормализации масс-спектров, созданию матрицы признаков, определению переменных и классификации с интерпретацией результатов. Из чего следует заключить, что биоинформационный анализ данных MALDI-TOF MS с помощью среды языка программирования «R» позволяет дифференцировать образцы крови больных бруцеллезом от условно здоровых людей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бруцеллез – зоонозная инфекция, характеризующаяся полиорганной патологией и склонностью к хронизации. Значимым патогенетическим компонентом бруцеллеза является аллергическая реактивность. Кроме того, данное инфекционное заболевание сопровождается поражением опорно-двигательной, нервной, сердечно-сосудистой, урогенитальной и других систем организма, нередко приводя к инвалидизации больных [121]. Последнее, во многом, определяет актуальность совершенствования мер по борьбе с инфекцией.

По современным представлениям род *Brucella* включает 12 самостоятельных видов, которые обладают отличными друг от друга генетическими, биохимическими, антигенными и вирулентными характеристиками: *B. melitensis* [113, 116, 118], *B. abortus* [97, 102]; *B. suis* [136]; *B. neotomae* [54]; *B. ovis* [139]; *B. canis* [87]; *B. ceti* [158]; *B. pinnipedialis* [97]; *B. microti* [132]; *B. inopinata* [131, 164], *B. ovis* [157], *B. vulpis* [133]. Некоторые виды *Brucella* spp., исходя из возможных угроз жизни и здоровью населения, являясь патогенами, могут представлять опасность как потенциальное биологическое оружие.

Учитывая вышесказанное, идентификация и дифференциация изолятов бруцеллеза из очагов инфекции на конкретных территориях имеет важное эпидемиологическое значение с точки зрения классификации очагов, оценки степени напряженности эпизоотического процесса, выявления путей распространения возбудителя [21].

В то же время, классификация возбудителей бруцеллеза на виды и биовары до сих пор опирается, в основном, на фенотипические характеристики, вследствие чего иногда возникают трудности в интерпретации результатов из-за отсутствия необходимого уровня точности анализа при использовании существующих диагностических методов.

Разработка и использование алгоритмов идентификации патогена с применением современных методов исследования позволяет осуществлять молекулярно-генетическую и протеомную характеристику выделяемых культур патогена на штаммовом уровне.

В связи с этим, актуальным представляется изучение возможности разработки эффективных молекулярных методов идентификации и типирования штаммов возбудителя бруцеллеза.

В последние годы при дифференциации клинически значимых видов бруцелл помимо существующих подходов, все чаще активно используются масс-спектрометрические методы исследования. В частности, была показана возможность применения метода MALDI-TOF MS для дифференциации бактерий рода *Brucella* на уровне видов [86]. К основным задачам белкового профилирования можно отнести не только качественное определение экспрессии генов путем анализа протеома, но и мониторинг частоты встречаемости экспрессируемых белков на уровне рода и вида микроорганизма [63, 123]. Кроме того, такие ключевые параметры времяпролетной масс-спектрометрии как чувствительность и специфичность, определяют ее потенциал для прямой детекции возбудителя бруцеллеза в рутинной клинической практике [98]. Вместе с тем, масс-спектрометрический анализ видов и биоваров изолятов *Brucella* spp. в программе MALDI Biotyper позволил выявить несоответствия между полученными результатами и классической таксономией, основанной на фенотипических признаках [86]. Полученные сходные спектры для штаммов *B. abortus* и *B. melitensis* затруднили однозначную дискриминацию представителей этих видов. Учитывая ошибочные результаты идентификации видов и биоваров бруцелл при анализе с помощью MALDI Biotyper, представляется востребованным использование статистического моделирования на основе коммерческого ПО ClinProTools (Bruker Daltonics, Германия). В качестве основных ограничений для эксплуатации этого подхода выступают относительно высокая стоимость ПО и расходных материалов, необходимость стандартизации условий культивирования штаммов бруцелл и протоколов пробоподготовки.

В ходе настоящего исследования была оптимизирована методика обеззараживания и подготовки проб культур возбудителя бруцеллеза при работе методом MALDI-TOF MS с вирулентным штаммом *B. melitensis* 548 и с использованием в качестве инактивирующего агента этанола, согласно которой бактериальную суспензию с добавлением 900 мкл спирта этилового 95 % инкубировали при температуре 30 °С в течение 90 мин. После проведенной инактивации образцы суспензии центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин, супернатант отбирали. Для полного удаления спирта процедуру центрифугирования повторяли. В ходе проведенных исследований было подтверждено, что предложенный способ обеззараживания не оказывает влияния на качество масс-спектров и на дальнейший ход анализа. Были подобраны оптимальные режимы масс-спектрометрического анализа белковых экстрактов штаммов возбудителя бруцеллеза, обеспечивающие воспроизводимое получение качественных данных. Было экспериментально установлено, что при равном

соотношении компонентов матрица/образец наблюдается сохранение необходимой интенсивности пиков с минимальной их фрагментацией.

Следующий этап исследования позволил экспериментально подтвердить преимущества использования агара Альбими при подготовке культур возбудителя бруцеллеза для исследования методом MALDI-TOF MS. Влияние состава агара Альбими, бруцеллагара и эритрит-агара, используемых при культивировании бруцелл, на качество масс-спектров экстрактов выращенных штаммов, полученных с использованием процедуры пробоподготовки, оценивали на примере анализа белковых экстрактов вакцинных штаммов *B. melitensis* Rev-1 и *B. abortus* 19 BA. Общее количество идентифицированных пиков на спектрах для штамма *B. melitensis* Rev-1, культивированных на агаре Альбими, бруцеллагаре и эритрит-агаре составило  $77 \pm 3$ ,  $65 \pm 5$  и  $41 \pm 4$  соответственно. При использовании вышеуказанных питательных сред суммарное количество сигналов для штамма *B. abortus* 19 BA, составило  $96 \pm 5$ ,  $89 \pm 4$ , и  $52 \pm 4$  соответственно. Абсолютная интенсивность мажорных пиков на полученных масс-спектрах в случае использования агара Альбими составляла: (a.i.)  $35187 \pm 530$ ,  $48698 \pm 435$ ,  $54751 \pm 560$ , что существенно превосходило аналогичные сигналы для исследуемых образцов белковых экстрактов с использованием бруцеллагара ( $13810 \pm 240$ ,  $15035 \pm 310$ ,  $13845 \pm 295$  соответственно) и эритрит-агара ( $11281 \pm 150$ ,  $11692 \pm 220$ ,  $12877 \pm 200$  соответственно). Специфичные мажорные сигналы на белковых профилях бруцелл, культивируемых на агаре Альбими, обладали наибольшей интенсивностью, что обусловлено, на наш взгляд, максимальным ростостимулирующим эффектом данного питательного субстрата. Из чего следует, что применение агара Альбими в качестве питательной среды при подготовке образцов культур бруцелл для масс-спектрометрического анализа является оптимальным.

На основании экспериментальных данных был сформирован комплекс критериев для оценки качества референсных масс-спектров чистых культур возбудителя бруцеллеза для диапазона измерений от 2000 до 20000 Да. Анализ белковых профилей исследованных штаммов возбудителя бруцеллеза позволил установить следующие оптимальные значения характеристик валидного масс-спектра: абсолютная интенсивность пиков  $I > 500$ , разрешение  $R > 150$ , общее число идентифицированных пиков от 65 до 100, отношение сигнал/шум – 15.

Масс-спектрометрическое определение родовой/видовой принадлежности микроорганизмов *Brucella* spp. проводили с использованием шести видов и биоваров



возбудителя: *B. abortus* – 26 штаммов, *B. melitensis* – 24 штамма, *B. suis* – 26 штаммов, *B. ovis* – 11 штаммов, *B. canis* – 3 штамма, *B. neotomae* – 6 штаммов. Использование интегрированных инструментов программного пакета Biotyper DB v 3.1 Offline Classification позволило наглядно отобразить сходство белковых профилей представителей разных видов возбудителя бруцеллеза. Кластеризация, построенная на основании полученных белковых профилей штаммов *Brucella* spp. с использованием указанного ПО, не позволила провести однозначную общепринятую межвидовую дифференциацию культур возбудителя, которая согласовалась бы с соответствующими результатами молекулярно-генетических и иных методов: штаммы бруцелл видов *melitensis* и *abortus*, группировались в родственный кластер; вид *B. suis* образовывал единый родственный кластер, однако отдельные штаммы этого вида при выборе разных алгоритмов анализа входили в смешанные кластеры со штаммами других видов; виды *B. canis*, *B. neotomae* и *B. ovis* группировались в смешанные, удаленные друг от друга, кластеры; вакцинные штаммы *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 19 ВА сформировали собственный отдельный субкластер. Исходя из полученных данных представляется очевидным, что использование указанного ПО для межвидового типирования штаммов возбудителя бруцеллеза не эффективно, что также подтверждается относительно высокими значениями показателей различия (Distance Level) для смешанных кластеров, включающих разные виды бруцелл.

Принимая во внимание сложность дифференциации штаммов микроорганизмов рода *Brucella* на основании полученных масс-спектрометрических данных, нами было дополнительно использовано некоммерческое ПО. Для интерпретации исходных MALDI-TOF MS данных был апробирован прикладной пакет биоинформационного анализа RGL в среде языка программирования «R». Построенная классификация позволяла провести дифференциацию штаммов трех видов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*. Представляется востребованным использование дополнительных средств биоинформационного анализа данных времяпролетной масс-спектрометрии белковых экстрактов культур не только в целях межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза, имеющих клиническое значение: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, но и для уточнения распределения частот встречаемости видоспецифичных маркерных пиков на масс-спектрах.

В ходе сравнительного анализа полученных масс-спектрометрических данных белковых экстрактов всех коллекционных штаммов *Brucella* spp. в интервале масс 2000 – 20000 Да была установлена группа общих отличающихся по интенсивности пиков ( $m/Z \pm 5$

Да): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 5036, 4545, 4770, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068, некоторые из которых описаны в работе Ferreira с соавт. (2010). Выявлены маркеры, встречающиеся только у представителей видов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*. Кроме консервативных родо- и видоспецифичных маркеров на масс-спектрах возбудителя бруцеллеза были обнаружены штаммоспецифичные сигналы. Сравнительный анализ с масс-спектрометрическими данными зарубежных ученых позволил наглядно подтвердить специфичность выявленных нами маркеров для представителей шести видов *Brucella* spp., которые, на наш взгляд, могут быть использованы для специфичной детекции возбудителя бруцеллеза в материале от больных. Полученные в результате проведенного исследования данные послужили основанием для разработки алгоритма идентификации культур *Brucella* spp. методом времяпролетной масс-спектрометрии.

В ходе выполнения работы была сформирована пополняемая база характеристичных белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза из коллекции ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, включающая 96 референсных масс-спектров основных рибосомных белков штаммов *Brucella* spp. (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis*). На основании анализа белковых профилей экстрактов культур бруцелл в среде Biotyper DB v 3.1 Offline Classification с применением сформированной базы данных подтверждена высокая эффективность применения метода MALDI-TOF MS для достоверной идентификации и типирования культур возбудителя бруцеллеза.

Возможность выявления *Brucella* spp. в пробах биологического происхождения методом MALDI-TOF MS исследовали в эксперименте с модельными клиническими образцами. Оценку возможности индикации бруцелл в модельных клинических образцах крови условно здоровых людей проводили с использованием 26 культур возбудителя двух видов: *B. abortus* и *B. melitensis*. В качестве отрицательного контроля использовали пробы крови условно здоровых людей (не больных, не переболевших бруцеллезом и не вакцинированных против этой инфекции). В результате сравнительного анализа суперспектра отрицательного контроля и масс-спектров экстрактов модельных образцов крови выявлена группа из 30 уникальных общих сигналов. Полученные данные являются экспериментальным доказательством появления изменений качественных характеристик белкового профиля крови человека в присутствии комплекса белков возбудителя бруцеллеза. На этом этапе было также подтверждено предположение, что использование белковых экстрактов лейкоцитарной фракции крови для выявления возбудителя бруцеллеза

в образцах крови методом MS является оптимальным. Охарактеризован комплекс сигналов, позволяющий достоверно дифференцировать кровь условно здорового человека и контаминированную возбудителем бруцеллеза.

Полученные результаты позволили разработать схему пробоподготовки модельных клинических образцов крови, которую в последующем использовали для подготовки клинического материала при исследовании методом MALDI-TOF MS.

С целью совершенствования алгоритма применения MALDI-TOF MS для прямой детекции возбудителя бруцеллеза в биоматериале исследовали профили белковых экстрактов крови биопробных животных, зараженных патогенными штаммами бруцелл: *B. melitensis* 548, *B. abortus* 544 и *B. suis* 1330. В качестве отрицательного контроля использовали пробы крови не зараженных животных. Для белковых профилей образцов отрицательного контроля были выявлены общие фрагменты. В ряде случаев области  $m/Z$  содержащие сигналы, в том числе с высоким значением абсолютной интенсивности, совпадали с областями значений масс, в которых, как правило, регистрировались специфичные для представителей рода *Brucella* пики. Анализ MALDI-TOF масс-спектров белковых экстрактов лейкоцитов крови инфицированных животных всех групп позволил выявить 11 общих сигналов ( $m/Z \pm 5$  Да): 2250, **2581**, **3025**, 3640, **3696**, **3754**, **4545**, **6672**, 7905, 8351, 14504 (курсивом отмечены родоспецифичные маркеры *Brucella* spp.). Частота регистрации шести родоспецифичных сигналов бруцелл, отличающихся по абсолютной интенсивности, составляла 0,98. Визуализация данных, построенная методом PCA, отражала распределение проб крови искусственно инфицированных животных компактно и дискретно от крови мышей из группы отрицательного контроля. Наблюдалось явное разделение образцов крови мышей при остром бруцеллезе на две группы: первую формировали животные, зараженные культурами *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 548; вторую - животные, инфицированные *B. suis* 1330. Распределение образцов на основании MS данных полностью соответствовало видовой принадлежности используемых при заражении штаммов, что, вероятно, могло быть связано с разным уровнем экспрессии белков у трех видов бруцелл при инфекционном процессе. Результаты эксперимента позволили подтвердить возможность выявления специфичных маркеров *Brucella* spp. в биоматериале методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце на стадии пробоподготовки.

Исследование возможности применения MALDI-TOF MS для анализа проб клинического материала (кровь) от людей с острой формой заболевания проводили в сравнении с экстрактами крови условно здоровых людей (отрицательный контроль) и штаммов бруцелл. Масс-спектры проб крови больных бруцеллезом людей содержали отсутствующие на масс-спектрах контрольной группы сигналы ( $m/Z \pm 5$  Да): 2014, 2085, **2422**, **3268**, **3336**, **3696**, 4025, 4124, 4156, 4252, 4516, 4914, **5360**, 5499, 5558, 5940, **6672**, 6860, **7048**, 7147, 7566, 7885, 8311, 9824, 10039, 15132, 15873 (курсивом отмечены родоспецифичные для бруцелл). Остальные выявленные общие сигналы были нехарактерны для профилей условно здоровых людей и масс-спектров культур *Brucella* spp. Существенное изменение количественных характеристик каждого сигнала, по нашему мнению, возможно коррелирует с концентрацией возбудителя в крови больного бруцеллезом. Комплекс из указанных специфичных для представителей *Brucella* spp. сигналов позволяет точно дифференцировать масс-спектры условно здоровых людей от больных бруцеллезом без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце (для вероятности 0,95: чувствительность составила 90,48 %, специфичность – 96,3 %, точность – 97,67 %).

На заключительном этапе была разработана схема биоинформационного анализа данных MALDI-TOF MS с помощью среды языка программирования «R», которая позволила дифференцировать образцы крови больных бруцеллезом от условно здоровых людей. Разработанный алгоритм интерпретации масс-спектрометрических данных позволил обеспечить два наиболее важных критерия качества классифицирования анализируемых объектов: компактность групп и их дискретность. Использование разработанной нами методики пробоподготовки крови, подозрительной на инфицирование бруцеллами, в сочетании с предлагаемым биоинформационным подходом к анализу MALDI-TOF MS данных в среде языка программирования «R», позволило проводить выявление группы общих сигналов, характерных исключительно только для белковых профилей образцов крови больных бруцеллезом людей без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце на стадии пробоподготовки.

В результате проведенной работы был разработан методический подход для детекции и межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием современных биоинформационных технологий.

## ВЫВОДЫ

1. Охарактеризованы особенности штаммов *Brucella* spp. разного таксономического положения (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*) на основании анализа белковых профилей бактериальных экстрактов культур возбудителя методом времяпролетной масс-спектрометрии.

2. Впервые создана открытая пополняемая электронная база референсных белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза, полученных с использованием метода MALDI-TOF MS, на основе коммерческой платформы «BioTyper» («Bruker Daltonics», Германия).

3. Впервые разработана схема идентификации возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF MS, включающая следующие этапы:

- культивирование бруцелл на агаре Альбими согласно разработанной методике;
- обеззараживание образца раствором 70 % этанола и пробоподготовка культур в стандартизированных для *Brucella* spp. условиях;
- экстракция белковой фракции из бактериальной суспензии возбудителя раствором 70 % муравьиной кислоты и ацетонитрилом;
- регистрация суммарного масс-спектра образца на масс-спектрометре;
- контроль качества масс-спектров (нормализация интенсивности пиков, коррекция базовой линии, выравнивание  $m/Z$  пиков, обнаружение сигналов) с использованием специализированного ПО для анализа масс-спектрометрических данных (среда языка программирования «R» и «Mass-Up»), выявление аналитически значимых пиков.

4. Показана эффективность среды языка программирования «R» для биоинформационной обработки данных времяпролетной масс-спектрометрии белковых экстрактов культур в целях межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза, имеющих клиническое значение: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*.

5. Экспериментально обосновано применение агара Альбими в качестве питательной среды при подготовке образцов культур бруцелл для масс-спектрометрического анализа.

6. Разработана методика обеззараживания и пробоподготовки крови, подозрительной на присутствие возбудителя бруцеллеза, для анализа методом

времяпролетной масс-спектрометрии, включающая процедуру получения суспензии лейкоцитов для последующего исследования, что позволяет значительно повысить качество белковых профилей.

7. Впервые показана возможность выявления специфичных маркеров возбудителя бруцеллеза в крови больных с острой формой заболевания методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце на стадии пробоподготовки. Установлено присутствие выявленных общих фрагментов для белковых профилей экстрактов лейкоцитов крови людей при остром бруцеллезе, в том числе 7 родоспецифичных для бруцелл ( $m/Z \pm 5$  Да): 2422, 3268, 3336, 3696, 5360, 6672, 7048, позволяющих проводить точную дифференциацию масс-спектров условно здоровых людей от больных бруцеллезом (для вероятности 0,95: чувствительность составила 90,48 %, специфичность – 100,00 %, точность – 97,26 %).

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Полученные результаты могут быть использованы в качестве научной основы для разработки эффективного методического подхода для прямого выявления и идентификации возбудителя бруцеллеза в крови с использованием MALDI-TOF MS. Разработка и внедрение схемы детекции и экспресс-типирования бруцелл на основании данных MALDI-TOF MS может способствовать повышению эффективности противоэпидемических мероприятий при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

a.i.	Абсолютная интенсивность сигнала Стандарты, техническая документация и сопутствующая информация (от англ. «American Society for Testing and Materials») Несмещенная (достоверная) бутстреп-вероятность Бутстреп-вероятность
DDA	Диагональный дискриминантный анализ (от англ. «Diagonal D
ESI	Электроспрей или ионизация распылением в электрическом поле (ESI, от англ. «Electrospray Ionization») $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота
LDA	Линейный дискриминантный анализ (от англ. «Linear Discriminant
m/Z	Соотношение массы иона к заряду
O	Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной л
MDS	multidimensional scaling
MS (MC)	Масс-спектрометрия (от англ. «Mass Spectrometry»)
MSP	С
NGS	от англ. «Next Generation Sequencing»
PCA	Метод главных компонент (от англ. «Principal Component Analysis»)
SASP	Малые кислоторастворимые белки спор (от англ. «Small Acid-Soluble Коэффициент соответствия (от англ. «score Value»)
SNIP	Функция биоинформационного анализа для устранения фоновых ш
SNP	Однонуклеотидные полиморфизмы (от англ. «Single Nucleotide Polymorphisms»)
SNR	Функция биоинформационного анализа для определения локальных максимумов (от англ. «Signal-To-Noise Ratio»)
SQRT	Функция биоинформационного анализа для коррекции интенсивностей пиков на масс-спектрах (метод квадратного корня дисперсии, от англ.

ТФА (ТФК)	Трифторуксусная кислота
ТИС	Полный ионный ток (от англ. «Total Ion Current»)
ББА	Бомбардировка быстрыми атомами
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ДВ	Дистиллированная вода
ЛД	Лазерная десорбция
М.к./мл	Количество микробных клеток в 1 мл
Мин	Минута
Мкл	Микролитр
Мкм	Микрометр
Мл	Миллилитр
МФА	Иммунофлуоресцентный анализ (Метод флуоресцирующих антител)
Об/мин	Количество оборотов в минуту
ООИ	Особо Опасные Инфекции
ПО	Программное Обеспечение
ПЦР	Полимеразная Цепная Реакция



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов, Д.А. Получение рекомбинантных HU-белков из *S. Melliferum* и *M. Gallisepticum* и их комплексов с дцДНК для структурных ЯМР-исследований / Д.А. Алтухов, Ю.К. Агапова, А.В. Власкина, Д.А. Корженевский, А.Ю. Николаева, А.М. Франк-Каменецкая, Т.В. Ракитина // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2016. – Т. 57. – №. 4.
2. Ващенко, В.И. Развитие представлений о белках с доменом холодового шока. Перспективы применения в лекарственной терапии / В.И. Ващенко, В.Н. Вильянинов, П.Д. Шабанов // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2011. – Т. 9. – № 3 – С. 3–30.
3. Вершилова П.А. Эпидемиология бруцеллёза / П.А. Вершилова, А.А. Голубева // Бруцеллёз. – М., 1972. – С. 319-284.
4. Вершилова, П.А. Бруцеллёз / П.А. Вершилова. – М.: Медгиз, 1961. – 414 с.
5. Дентовская, С.В. Бруцеллез в Саратовской области: клинико-эпидемиологические аспекты, совершенствования лабораторной диагностики: дис... канд. мед. наук: 03.00.07/ Санникова Светлана Владимировна. – Саратов, 2000. – 127 с.
6. Еременко, Е.И. Генотипические особенности штаммов *Bacillus anthracis* с разным проявлением признаков, ассоциированных с патогенностью / Е.И. Еременко, А.Г. Рязанова, Е.А. Цыганкова, О.И. Цыганкова, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – № 104. – С.53-56.
7. Желудков, М.М. Бруцеллёз в России: современная эпидемиология и лабораторная диагностика: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 03.00.07 / Желудков Михаил Михайлович. – М., 2009. – 50 с.
8. Каримова, Т.В. Энтеропатогенные иерсинии: микробиологический мониторинг, молекулярно-биологические особенности, алгоритм лабораторной диагностики: дис... канд. мед. Наук: 03.02.03/ Каримова Татьяна Викторовна. – Иркутск, 2017. – 163 с.
9. Касьян Ж.А. Разработка тест-системы для дифференциации видов бруцелл методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени / Ж.А. Касьян, Н.А. Осина, С.А. Щербакова // Пробл. особо опасн. инфекций – 2016. – Вып. 3. – С. 47-51.
10. Касьян, Ж.А. Апробация нового генодиагностического препарата при исследовании проб биологического материала на наличие возбудителя бруцеллеза / Ж.А. Касьян, Н.А. Осина, И.А. Касьян, И.Н. Шарова, Е.С. Казакова // Здоровье населения и среда обитания – 2016. – Вып. 4 (277). – С. 48-50.

11. Кошерава, Б.Н. Эффективность этиопатогенетического лечения хронического бруцеллёза / Б.Н. Кошерава // Медицина и экология. – 2012. - № 3. – С. 69-72.
12. Кулаков, Ю.К. Метод ПЦР в лабораторной диагностике бруцеллёза / Ю.К. Кулаков, М.М. Желудков, Т.А. Толмачева, Л.Е. Цирельсон // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – № 2 (51). – С. 29-33.
13. Ломинадзе, Г.Г. Использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускорения идентификации микроорганизмов в гемокультурах пациентов с подозрением на сепсис / Ломинадзе Г.Г., Семенова Е.А., Мотузова О.В., Калакуцкая А.Н., Лазарева А.В. // Лаборатория ЛПУ. – 2014. – Т. 4. – С. 17-20.
14. Майский, В.Г. Определение дезаминаз аденина и аденозина у бактерий рода *Brucella* / В.Г. Майский, Р.Е. Цыганкова, А.И. Калиновский, Л.П. Репина // Актуальные вопросы профилактики бруцеллеза и организации мед. помощи больным: тез. докл. Всесоюзн. конфер., Новосибирск, 24-25 октября 1989 г. – Москва, 1989. – С. 85-86.
15. Малов, В.А. Терапевтические маски бруцеллёза / В.А. Малов // Фарматека. – 2011. - № 4. – С. 22-28.
16. МУК 3.1.7.3402-16 Эпидемиология. Профилактика инфекционных болезней. Инфекции, общие для человека и животных. Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ А.Ю. Поповой 10.11.2016 г.). – М. -2017. – 60 с.
17. Нурпейсова, А.Х. Серомониторинг за лицами профессиональной группы риска по бруцеллезу / А.Х. Нурпейсова, Г.В. Берёзкина, С.Ю. Штрек, Н.А. Зеликман, Н.А. Кузьменко // Национальные приоритеты России. - 2017. - № 4 (26). – С. 137–139.
18. Оракбай, Л.Ж., Современные аспекты эпидемического процесса бруцеллеза / Л.Ж. Оракбай, Л.Ю. Черепанова, Т.Г. Денисова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №. 6. – С. 12-12.
19. Осина, Н.А. Определение видовой принадлежности штаммов бруцелл из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» с помощью амплификационных и рестрикционных технологий / Н.А. Осина, Ж.А. Касьян, О.Ю. Ляшова, А.В. Осин // Пробл. особо опасн. инфекций – 2016. – Вып. 4. - С. 69-74.
20. Останкова, Ю.В. Идентификация *Stenotrophomonas maltophilia* с использованием методов прямого секвенирования 16s рРНК и MALDI-ToF масс-спектрометрии / Ю.В. Останкова, А.В. Семенов, Е.В. Зуева, М.А. Вашукова, А.А. Тотолян // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – Т. 62. – №. 3. – С. 37-42.

21. Пономаренко, Д.Г. Анализ эпидемической и эпизоотической ситуации по бруцеллезу в мире в 2019 г. и прогноз на 2020 г. в Российской Федерации / Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова, А.А. Хачатурова, О.Н. Скударева, О.В. Логвиненко, Е.Л. Ракитина, М.В. Костюченко, О.В. Семенко, О.В. Малецкая, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – Т. 2 – С. 48-56.
22. Попов, П.Н. Иммунологические параллели у лиц, положительно реагирующих на бруцеллёр / П.Н. Попов, О.М. Павлова, И.В. Санникова // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2007. – № 2 – С. 45–47.
23. Резникова Л.С. Серологические методы исследования при диагностике инфекционных болезней / Л.С. Резникова, Р.В. Эпштейн-Литвак, М.И. Леви. — М., 1977. — 159 с.
24. Санникова, И.В. Бруцеллёр (клиника, диагностика, лечение, организация медицинской помощи): методическое пособие для врачей-инфекционистов и врачей общей практики/ И.В. Санникова, П.Н. Попов, О.М. Павлова, М.В. Титоренко, Д.А. Дейнека, О.В. Махия, О.Г. Голубь // Ставрополь: изд. СтГМУ, 2015. – 84 с.
25. Сергеева, И.В. Ошибки в диагностике хронического бруцеллёза // Современные проблемы науки и образования / И.В. Сергеева – 2013. – № 4. – URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=9838> (дата обращения: 10.01.2019).
26. Спицын А.Н. Применение MALDI масс-спектрометрии в диагностике особо опасных инфекционных болезней: современное состояние и перспективы / А.Н. Спицын, Д.В. Уткин, В.Е. Куклев, С.А. Портенко, В.Г. Германчук, Н.А. Осина // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – №. 3. – С. 77-82
27. Спицын, А.Н. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ штаммов возбудителя чумы / А.Н. Спицын, Д.В. Уткин, Н.Е. Щербакова, С.А. Портенко, А.С. Абдрашитова, И.А. Касьян, В.Г. Германчук, В.Е. Куклев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – №. 2. – С. 91-94
28. Спицын, А.Н. Применение MALDI масс-спектрометрии в диагностике особо опасных инфекционных болезней: современное состояние и перспективы / Д.В. Уткин, В.Е. Куклев, С.А. Портенко, В.Г. Германчук, Н.А. Осина // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – №. 3. – С. 77-82\
29. Телесманич Н.Р. Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF в идентификации и типировании штаммов холерных вибрионов / Н.Р.Телесманич, С.О. Чайка, И.А. Чайка, Е.В. Гончаренко, Ю.М. Ломов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61. – №. 6. – С. 57-61.
30. Центр загрузки высокоуровневого интерпретируемого языка программирования MATLAB [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://matlab.ru>

31. Центр загрузки высокоуровневого интерпретируемого языка программирования R [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://CRAN.R-project.org>
32. Центр загрузки программного обеспечения Bruker [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://bruker-daltonics-clinprottools.software.informer.com>
33. Центр загрузки программных пакетов высокоуровневого интерпретируемого языка программирования R [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://bioconductor.org/packages/release/BiocViews.html#MassSpectrometry>
34. Шаров Т. Н. и др. Проблемы идентификации различных штаммов вегетативной формы *Bacillus anthracis* методом MALDI-ToF MS / Т.Н. Шаров, М.П. Червакова, И.А. Баркова, А.М. Барков, Д.В. Викторов, А.В. Топорков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – Т. 62. – №. 5. – С. 62-64
35. Ahn, S.H. Quantitative reproducibility of mass spectra in matrixassisted laser desorption ionization and unraveling of the mechanism for gasphase peptide ion formation / S.H. Ahn, K.M. Park, Y.J Bae, M.S. Kim // Journal of Mass Spectrometry. – 2013. – Vol. 48. – №. 3. – P. 299-305.
36. Ahn, S.H., Bae Y. J., Kim M. S. Matrix-assisted variable wavelength laser desorption ionization of peptides; influence of the matrix absorption coefficient on expansion cooling /S.H. Ahn, Y.J. Bae, M.S. Kim // Bulletin of the Korean Chemical Society – 2012. – Vol. 33(9). – P. 2955-2960.
37. Al Dahouk, S. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy / S. Al Dahouk, K. Nöckler // Expert Rev Anti-Infect Ther. – 2011. – Vol. 9. – №. 7. – P. 833-845.
38. Allardet-Servent, A. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella* / A. Allardet-Servent, G. Bourg, M. Ramuz, M. Pages, M. Bellis, G. Roizes // J. of bacteriology. – 1988. – Vol. 170 (10). – P. 4603-7.
39. Amenov, A.A. Development and application of rapid xtreme chain reaction and loop-mediated isothermal amplification assays for the detection of leukaemia and brucellosis of cattle / A.A. Amenov, R.N. Kalendar, S.K. Abeldenov, A.S. Musakhmetov, P.K. Li, A.K. Kiribayeva, B.B. Khassenov // Eurasian J. Appl. Biotechnol. – 2017. – Vol. 3. – P. 49-55.
40. Angeletti, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology / S. Angeletti // Journal of microbiological methods. – 2017. – Vol.138. – P. 20-29.
41. Anhalt J.P. Identification of bacteria using mass spectrometry /J.P. Anhalt, C. Fenselau//Analytical chemistry. – 1975. – Vol. 47. – №. 2. – P. 219-225.
42. Asaad, A.M. Serological and molecular diagnosis of human brucellosis in Najran, Southwestern Saudi Arabia / A.M. Asaad, J.M. Alqahtani // J. Infect. Public. Health. - 2012 (Apr). –Vol. 5(2). – P. 189-94. doi: 10.1016/j.jiph.2012.02.001.

43. Ayyadurai, S. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry/S. Ayyadurai, C. Flaudrops, D. Raoult, M. Drancourt//BMC microbiology. – 2010. – Vol. 10. – №. 1. – P. 285.
44. Bae, Y. J. Degree of ionization in MALDI of peptides: thermal explanation for the gas-phase ion formation / Y.J. Bae, Y.S. Shin, J.H. Moon, M.S. Kim // Journal of The American Society for Mass Spectrometry. – 2012. – Vol. 23. – №. 8. – P. 1326-1335.
45. Bae, Y.J. A thermal mechanism of ion formation in MALDI /Y.J. Bae, M.S. Kim//Annual Review of Analytical Chemistry. – 2015. – Vol. 8. – P. 41-60.
46. Barham, W.B. Paparello S. Misidentification of *Brucella* species with use of rapid bacterial identification systems / W.B. Barham, P. Church, J.E. Brown, S. Paparello //Clin. Infect. Dis. – 1993. – Vol. 17. - P. 1068-1069.
47. Barrett D. Conference Report: Advances in Metabolic Profiling //Bioanalysis. – 2012. – Vol. 4. – №. 6. – P. 643-644.
48. Cain, T.C. Differentiation of bacteria using protein profiles from matrixassisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry /T.C. Cain, D.M. Lubman, Jr. W.J. Weber, A. Vertes //Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 1994. – Vol. 8. – №. 12. – P. 1026-1030.
49. Callahan, C. The *Bacillus cereus* containing sub-branch most closely related to *Bacillus anthracis*, have single amino acid substitutions in small acid-soluble proteins, while remaining sub-branches are more variable / C. Callahan, E.R. Castanha, K.F. Fox, A. Fox //Molecular and cellular probes. – 2008. – Vol. 22. – №. 3. – P. 207-211.
50. Castanha, E.R. Rapid discrimination of *Bacillus anthracis* from other members of the *B. cereus* group by mass and sequence of «intact» small acid soluble proteins (SASPs) using mass spectrometry / E.R. Castanha, A. Fox, K.F. Fox //Journal of microbiological methods. – 2006. – Vol. 67. – №. 2. – P. 230-240.
51. Castrodale, L.J. A case-study of implementation of improved strategies for prevention of laboratory-acquired brucellosis / L.J. Castrodale, G.A. Raczniak, K.M. Rudolph, L. Chikoyak, R.S. Cox, T.L. Franklin, R.M. Traxler, M. Guerra //Safety and health at work. – 2015. – Vol. 6. – №. 4. – P. 353-356.
52. Chen, S. Rapid detection of *Brucella* spp. Using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) / Chen S., Li X., Li J. // Methods Mol. Biol. - 2013. – Vol. 1039. – P. 99-108.
53. Cherkaoui, A. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level / A. Cherkaoui, J. Hibbs, S. Emonet, M. Tangomo, M. Girard, P. Francois, J. Schrenzel //Journal of clinical microbiology. – 2010. – Vol. 48. – №. 4. – P. 1169-1175.

54. Corbel, M.J. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 5 and 7 July 1994, Prague, Czech Republic. Int. J. Syst. / M.J. Corbel, I. Moriyón // Evol. Microbiol. – 2006. – Vol. 56. – P.1169-1170.
55. Couderc, C. Comparing inactivation protocols of *Yersinia* organisms for identification with matrixassisted laser desorption/ionization timeofflight mass spectrometry /C. Couderc, C. Napez, M. Drancourt //RCM. – 2012. – Vol. 26. – №. 6. – P. 710-714.
56. Croxatto, A. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology / A. Croxatto, G. Prod'hom, G. Greub //FEMS microbiology reviews. – 2012. – Vol. 36. – №. 2. – P. 380-407.
57. Cutler, S.J. Brucellosis – new aspects of an old disease / S.J. Cutler, A.M. Whatmore, N.J. Commander // J Appl Microbiol. - 2005. – Vol. 98. - P. 1270-1281.
58. Dadar M. Molecular diagnosis of acute and chronic brucellosis in humans / M. Dadar, Y. Shahali, G. Wareth //Microbial Technology for the Welfare of Society. – Springer, Singapore. – 2019. – P. 223-245.
59. Dash, N. Misidentification of *Brucella melitensis* as *Bergeyella zoohelcum* by MicroScan WalkAway: a case report/ N. Dash, M. Al-Zarouni, A. Rattan, D. Panigrahi // Med Princ Pract. – 2012. – Vol. 21. – №. 5. – P. 495-497.
60. Daumas, A. MALDI-TOF MS monitoring of PBMC activation status in sepsis / A. Daumas, J. Alingrin, R. Ouedraogo, P. Villani, M. Leone, J.L. Mege //BMC infectious diseases. – 2018. – Vol. 18. – №. 1. – P. 355.
61. De massis, F. Distribution of *Brucella* field strains isolated from livestock, wildlife populations, and humans in Italy from 2007 to 2015 / F. De Massis, K. Zilli, G. Di Donato, R. Nuvoloni, S. Pelini, L. Sacchini, E. Di Giannatale// PlosONE. – 2019. – Vol. 14 (3). – P.0213689.
62. Del Vecchio, V.G. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis* / V.G. DelVecchio, V. Kapatral, R.J. Redkar, G. Patra, C. Mujer, T. Los, G. Reznik // Proc Natl Acad Sci USA. – 2002. – Vol. 99. – P. 443-448.
63. Dierig, A. The Fast Route to Microbe Identification: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) / A. Dierig, R. Frei, A. Egli //The Pediatric Infectious Disease Journal. – 2015. – Vol. 34. – №. 1. – P. 97-99.
64. Domon, B. Mass spectrometry and protein analysis / B. Domon, R. Aebersold // Science. - 2006.- Vol.312. – № 212. – P.7.
65. Dybwad, M. Rapid Identification of *Bacillus anthracis* Spores in Suspicious Powder Samples by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) / M. Dybwad, A.L. van der Laaken, J.M. Blatny, A. Paauw // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – Vol. 79. – №. 17 – P. 5372–5383.

66. Elhanany, E. Detection of specific *Bacillus anthracis* spore biomarkers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / E. Elhanany, R. Barak, M. Fisher, D. Kobiler, Z. Altboum // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2001. – Vol. 15. – №. 22. – P. 2110-2116.
67. Etemadi, A. Laboratory Diagnostic Procedures for Human Brucellosis: An Overview of Existing Approaches/ A. Etemadi, R. Moniri, H. Neubauer, Y.D. Goli, S. Alamian // *Jundishapur Journal of Microbiology*. – 2019. – Vol. 12. – №. 5. – P. 1-9.
68. European Centre for Disease Prevention and Control. Disease data from ECDC Surveillance Atlas – brucellosis. [Электронный ресурс]. URL: <https://ecdc.europa.eu/en/brucellosis/surveillance/atlas> (дата обращения 15.02.2020).
69. Fenselau, C. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry / C. Fenselau, P.A. Demirev // *Mass spectrometry reviews*. – 2001. – Vol. 20. – №. 4. – P. 157-171.
70. Fernández-Álvarez, C. Use of ribosomal proteins as biomarkers for identification of *Flavobacterium psychrophilum* by MALDI-TOF mass spectrometry / C. Fernández-Álvarez, Y. Torres-Corral, Y. Santos // *Journal of proteomics*. – 2018. – Vol. 170. – P. 59-69.
71. Ferreira, L. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures / L. Ferreira, S.V. Castaño, F. Sánchez-Juanes, S. González-Cabrero, F. Menegotto, A. Orduña-Domingo, J.L. Muñoz-Bellido // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5. – №. 12. – P. e14235.
72. Ficht, T. *Brucella* taxonomy and evolution / T. Ficht // *Future Microbiol.* - 2010. – Vol. 5. – P. 859-866.
73. Giebel, R. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): applications and challenges / R. Giebel, C. Worden, S.M. Rust, G.T. Kleinheinz, M. Robbins, T.R. Sandrin // *Advances in applied microbiology*. – Academic Press, 2010. – Vol. 71. – P. 149-184.
74. Grenga, L. Pathogen proteotyping: A rapidly developing application of mass spectrometry to address clinical concerns/ L. Grenga, O. Pible, J. Armengaud // *Clinical Mass Spectrometry*. – 2019. – Vol. 14. – P. 9-17.
75. Grenga, L. Pathogen proteotyping: A rapidly developing application of mass spectrometry to address clinical concerns / L. Grenga, O. Pible, J. Armengaud // *Clinical Mass Spectrometry*. – 2019. – Vol. 14. – P. 9-17.
76. Grunow, R. Brucellosis in a refugee who migrated from Syria to Germany and lessons learnt, 2016 / R. Grunow, D. Jacob, S. Klee, D. Schlembach, S. Jackowski-Dohrmann, V. Loenning-Baucke, S. Swidsinski // *Eurosurveillance*. – 2016. – Vol. 21. – №. 31. – P. 303-311.

77. Halling, S.M. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis* / S.M. Halling, B.D. Peterson-Burch, B.J. Bricker, R.L. Zuerner, Z. Qing, L.L. Li, S.C. Olsen // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187. – №. 8. – P. 2715-2726.
78. Hathout, Y. Identification of *Bacillus* spores by matrix-assisted laser desorption ionization–mass spectrometry / Y. Hathout, P.A. Demirev, Y.P. Ho, J.L. Bundy, V. Ryzhov, L. Sapp, C. Fenselau // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1999. – Vol. 65. – №. 10. – P. 4313-4319.
79. Hathout, Y. Small, acid-soluble proteins as biomarkers in mass spectrometry analysis of *Bacillus* spores / Y. Hathout, B. Setlow, R.M. Cabrera-Martinez, C. Fenselau, P. Setlow // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2003. – Vol. 69. – №. 2. – P. 1100-1107.
80. Heller, D.N. Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry / D.N. Heller, R.J. Cotter, C. Fenselau, O.M. Uy // *Analytical Chemistry.* – 1987. – Vol. 59. – №. 23. – P. 2806-2809.
81. Holland, R.D. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix assisted laser desorption/ionization with time of flight mass spectrometry // R.D. Holland, J.G. Wilkes, F. Rafii, J.B. Sutherland, C.C. Persons, K.J. Voorhees, J.O. Lay Jr // *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* – 1996. – Vol. 10. – №. 10. – P. 1227-1232.
82. Hubálek, Z. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*) / Z. Hubálek, H.C. Scholz, I. Sedláček, F. Melzer, Y.O. Sanogo, J. Nesvadbová // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2007. – Vol. 7. – №. 4. – P. 679-688.
83. Jacob, J. The *mglA* gene and its flanking regions in *Brucella*: The role of *mglA* in tolerance to hostile environments, Fe-metabolism and in vivo persistence / J. Jacob, A. Finke, M. Mielke // *International Journal of Medical Microbiology.* – 2012. – Vol. 302. – №. 3. – P. 148-154.
84. Kang, Y.X. Typing discrepancy between phenotypic and molecular characterization revealing an emerging biovar 9 variant of smooth phage-resistant *B. abortus* strain 8416 in China / X. Kang, Y. X.M. Li, D.R. Piao, G.Z. Tian, H. Jiang, E.H. Jia, Y.Z. Zhu // *Frontiers in microbiology.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1375.
85. Karas, M. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons // M. Karas, F. Hillenkamp // *Analytical chemistry.* – 1988. – Vol. 60. – №. 20. – P. 2299-2301
86. Karger, A. Interlaboratory Comparison of Intact-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Results for Identification and Differentiation of *Brucella* spp. / A. Karger, F. Melzer, M. Timke, B. Bettin, M. Kostrzewa, K. Nockler, A. Hohmann, H. Tomaso, H. Neubauer, S. Al Dahouk // *Journal of clinical microbiology.* – 2013. – Vol. 51. – №. 9. – P. 3123-3126.



87. Kim, J.S. Complete genome sequence of *Brucella canis* strain HSK A52141, isolated from the blood of an infected dog / J.S. Kim, W. Jeong, H.Y. Jeoung, J.Y. Song, H. Kim, J.H. Beak, S.C. Jung // *J. Bacteriol.* – 2012. – Vol. 194. – № 18. – P.5134.
88. Kim, J.Y. Immunoproteomics of *Brucella abortus* RB51 as candidate antigens in serological diagnosis of brucellosis / J.Y. Kim, S.R. Sung, K. Lee, H.K. Lee, S.I. Kang, J.J. Lee, M. Her // *Veterinary immunology and immunopathology.* – 2014. – Vol. 160. – №. 3-4. – P. 218-224.
89. Knochenmuss, R. Molecular dynamics simulations of MALDI: laser fluence and pulse width dependence of plume characteristics and consequences for matrix and analyte ionization / R. Knochenmuss, L.V. Zhigilei // *Journal of mass spectrometry.* – 2010. – Vol. 45. – №. 4. – P. 333-346.
90. Koubenakis, A. Time-resolved surface temperature measurement of MALDI matrices under pulsed UV laser irradiation / A. Koubenakis, V. Frankevich, J. Zhang, R. Zenobi // *The Journal of Physical Chemistry A.* – 2004. – Vol. 108. – №. 13. – P. 2405-2410.
91. Krishnamurthy, T. Detection of pathogenic and nonpathogenic bacteria by matrixassisted laser desorption/ionization timeofflight mass spectrometry / T. Krishnamurthy, U. Rajamani, P.L. Ross // *RCM.* – 1996. – Vol. 10. – №. 8. – P. 883-888.
92. Kumar, A. Oxidative Stress, Pathophysiology, and Immunity in Brucellosis / A. Kumar, A. Rahal, V.K. Gupta // *Oxidative Stress in Microbial Diseases.* – Springer, Singapore. – 2019. – P. 365-378.
93. Lasch, P. Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics / P. Lasch, M. Drevinek, H. Nattermann, R. Grunow, M. Stämmler, R. Dieckmann, D. Naumann // *Analytical chemistry.* – 2010. – Vol. 82. – №. 20. – P. 8464-8475.
94. Lasch, P. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks / P. Lasch, W. Beyer, H. Nattermann, M. Stammler, E. Siegbrecht, R. Grunow, D. Naumann // *Applied and environmental microbiology.* – 2009. – Vol. 75. – №. 22. – P. 7229-7242.
95. Lasch, P. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrixassistedlaser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: results of an interlaboratory ring trial / P. Lasch, T. Wahab, S. Weil, B. Pályi, H. Tomaso, S. Zange, V. Pflüger // *J Clin Microbiol.* – 2015. – Vol. 53. – P. 2632–2640.
96. Lasch, P. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of highly pathogenic bacteria / P. Lasch, D. Jacob, R. Grunow, T. Schwecke, J. Doellinger // *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* – 2016. – Vol. 85. – P. 103-111.
97. Le Flèche, P. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay / P. Le Flèche, I. Jacques, M. Grayon, S. Al Dahouk, P. Bouchon, F. Denoeud, G. Vergnaud // *BMC microbiology.* – 2006. – Vol. 6. – №. 1. – P. 9.

98. Lista, F. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS / F. Lista, F. Reubsæet, R. De Santis, R. Parchen, A. de Jong, J. Kieboom, A. van der Laaken, I. Voskamp-Visser, S. Fillo, H-J. Jansen, J. van der Plas, A. Paauw // *BMC microbiology*. – 2011. – Vol. 11. – №. 1. – P. 267.
99. Liu B. H. Initial ionization reaction in matrix-assisted laser desorption/ionization / B.H. Liu, O.P. Charkin, N. Klemenko, C.W. Chen, Y.S. Wang // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – Vol. 114. – №. 33. – P. 10853-10859.
100. Mantur, B. ELISA versus conventional methods of diagnosing endemic brucellosis / B. Mantur, A. Parande, S. Amarnath, G. Patil, R. Walvekar, A. Desai, S. Patil // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* - 2010. – Vol. 83. - P. 314-318.
101. Marcos, D.T. LAMP technology: Rapid identification of *Brucella* and *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* / D.T. Marcos, A.K. Gioffré, M.E.C. Cucchi // *Braz. J. Microbiol.* – 2015. – Vol. 46 (2). – P. 619-626.
102. Marx, A. Immunochemical studies on *Brucella abortus* lipopolysaccharides / A. Marx, J. Ionescu, A. Pop // *Zbl. Bacteriol.* – 1983. – Vol. 253. – № 4. – P. 544-553
103. Mesureur, J. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella* / Mesureur J., Arend S., Cellière B., Courault P., Cotte-Pattat P.J., Totty H., Burrowes V., Mesureur J., Arend S., Cellière B., Courault P., Cotte-Pattat P.J., Totty H., Burrowes V. // *PLoS neglected tropical diseases*. – 2018. – Vol. 12. – №. 10. – P. 68-74.
104. Mesureur, J. A simple and safe protocol for preparing *Brucella* samples for MALDI-TOF MS analysis / J. Mesureur, S. Ranaldi, V. Monnin, V. Girard, S. Arend, M. Welker, D. O'Callaghan, J.P. Lavigne, A. Keriel // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2015.
105. Mirnejad, R. Molecular investigation of virulence factors of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains isolated from clinical and non-clinical samples / R. Mirnejad, F.M. Jazi, S. Mostafaei, M. Sedighi // *Microbial pathogenesis*. – 2017. – Vol. 109. – P. 8-14.
106. Moon, J.H. Ion yields for some salts in MALDI: mechanism for the gas-phase ion formation from preformed ions / J.H. Moon, Y.S. Shin, Y.J. Bae, M.S. Kim // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2011. – Vol. 23. – №. 1. – P. 162-170.
107. Moreno, E., *Brucella* evolution and taxonomy / E. Moreno, A. Cloeckert, I. Moriyón // *Veterinary microbiology*. – 2002. – Vol. 90. – №. 1. – P. 209-227.
108. Nagy, E. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / E. Nagy, T. Maier, E. Urban, G. Terhes, M. Kostrzewa // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2009. – Vol. 15. – №. 8. – P. 796-802.
109. Nyvang Hartmeyer, G. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour / G. Nyvang Hartmeyer, A. Kvistholm Jensen, S. Böcher, M.

Damkjaer Bartels, M. Pedersen, M. Engell Clausen, M. Kemp //Scandinavian journal of infectious diseases. – 2010. – Vol. 42. – №. 9. – P 716-718.

110. Ohtsuki, R. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method / R. Ohtsuki, K. Kawamoto, Y. Kato, M.M. Shah, T. Ezaki, S.I. Makino// J. of Applied Microbiology. – 2008. – Vol. 104. – P. 1815–1823.

111. Osoba, A.O. Diagnostic value of Brucella ELISA IgG and IgM in bacteremic and non-bacteremic patients with brucellosis / A.O. Osoba, H. Balkhy, Z. Memish, M.Y. Khan, A. Al-thagafi, B. Al Shareef, G.A. Oni // J. Chemother. - 2001. – Vol. 13 (Suppl. 1). - P. 54-59.

112. Osoro, E.M. Strong association between human and animal Brucella seropositivity in a linked study in Kenya, 2012–2013/ E.M. Osoro, P. Munyua, S. Omulo, E. Ogola, F. Ade, P. Mbatha [et al.] // Am J Trop Med Hyg. – 2015. – Vol. 93. – №. 2. – P. 224-231.

113. Osterman, B. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella* / B. Osterman, I. Moriyón // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – Vol. 56. – P. 1173-1175.

114. Paulsen, I.T. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and 78 plant pathogens and symbionts / I.T. Paulsen, R. Seshadri, K.E. Nelson, J.A. Eisen, J.F. Heidelberg, T.D. Read, S.C. Daugherty // Proc Natl Acad Sci USA. – 2002. – Vol. 99. – P. 13148-1153.

115. Perez-Sancho, M. Development and evaluation of an IS711-based loop mediated isothermal amplification method (LAMP) for detection of *Brucella* spp. on clinical samples / M. Pérez-Sancho, T. García-Seco, L. Arrogante, N. García, I. Martínez, A. Diez-Guerrier, J. Alvarez // Res. Vet. Sci. – 2013. – Vol. 95. – P. 489-494.

116. Petrović, M. Brucellosis-the past, the present, the future / M. Petrović, Ž. Cvetnić //IOP Conf Ser Earth Environ Sci. – 2017. – Vol. 85. – №. 1. – P. 1755-1315.

117. Prem, Kumar Brucellosis: A Disease of Zoonotic Importance / Prem Kumar, R. Sunitha, A. Karthikeyan, V. Pradeep Kumar and Rajanna //Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2020. – Vol. 9. – №. 1. – P. 2107-2115.

118. Priyanka, S.B.N. Bovine brucellosis, A review on background information and perspective / S.B.N. Priyanka, S.K. Kashyap //Journal of Entomology and Zoology Studies. – 2019. – Vol. 7. – №. 2. – P. 607-613.

119. Prusty, B.R. A closed tube loop-mediated isothermal amplification assay for identification of *Brucella* Species in Bull Semen / B.R. Prusty, R. Tabassum, P. Chaudhuri, V.K. Chaturvedi, M. Saini, B.P. Mishra, P.K. Gupta // Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci. – 2018. – Vol. 88. – №. 2. – P. 707-713.

120. Prusty, B.R. Visual detection of *Brucella* spp. in spiked bovine semen using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay / B.R. Prusty, P. Chaudhuri, V.K. Chaturvedi, M. Saini, B.P. Mishra, P.K. Gupta // *Indian J. Microbiol.* - 2016. – Vol. 56. – P. 142-147.
121. Roth, F. Brucellosis Surveillance and Control: a Case for One Health / F. Roth, J. Kasymbekov, E. Schelling // *One Health: The Theory and Practice of Integrated Health Approaches.* – 2015. – P. 153.
122. Ruelle, V. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / V. Ruelle, B.E. Moulaj, W. Zorzi, P. Ledent, E.D. Pauw // *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* – 2004. – Vol. 18. – №. 18. – P. 2013-2019.
123. Ryzhov, V. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells / V. Ryzhov, C. Fenselau // *Analytical chemistry.* – 2001. – Vol. 73. – №. 4. – P. 746-750.
124. Ryzhov, V. Rapid characterization of spores of *Bacillus cereus* group bacteria by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry / V. Ryzhov, Y. Hathout, C. Fenselau // *Applied and environmental microbiology.* – 2000. – Vol. 66. – №. 9. – P. 3828-3834.
125. Sabrina, R. Detection of *Brucella* spp. in milk from seronegative cows by realtime polymerase chain reaction in the region of Batna, Algeria / R. Sabrina, H. Taha Mossadak, M. Bakir, M. Asma, B. Khaoula // *Veterinary World.* - 2018. - Vol. 11 (3). - P.363-367.
126. Sakarikou, C. Rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) / C. Sakarikou, M. Ciotti, C. Dolf, S. Angeletti, C. Favalli // *BMC microbiology.* – 2017. – Vol. 17. – №. 1. – P. 54.
127. Sali, M. Rapid and safe one-step extraction method for the identification of *Brucella* strains at genus and species level by MALDI-TOF mass spectrometry / M. Sali, F. De Maio, M. Tarantino, G. Garofolo, M. Tittarelli, L. Sacchini, M. Francia // *Plos one.* – 2018. – Vol. 13. – №. 6. – P.1-14
128. Sankarasubramanian, J. Identification of genetic variants of *Brucella* spp. through genome-wide association studies / J. Sankarasubramanian, U.S. Vishnu, P. Gunasekaran, J. Rajendhran // *Infection, Genetics and Evolution.* – 2017. – Vol. 56. – P. 92-98.
129. Savitzky, A. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures / A. Savitzky, M.J.E. Golay // *Analytical chemistry.* – 1964. – V. 36. – №. 8. – P. 1627-1639.
130. Scholz, H.C. Molecular characterisation of *Brucella* species / H.C. Scholz, G. Vergnaud // *Rev Sci Tech.* – 2013. – Vol. 32. – №. 1. – P. 149-162.
131. Scholz, H.C. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection / H.C. Scholz, K. Nöckler, C. Göllner, P. Bahn, G. Vergnaud, H. Tomaso, M.S. Zygmunt // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2010. – Vol. 60. – P.801-808.

132. Scholz, H.C. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis* / H.C. Scholz, Z. Hubalek, I. Sedláček, G. Vergnaud, H. Tomaso, S. Al Dahouk, M. Maquart // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2008. – Vol. 58. – P.375-382.
133. Scholz, H.C. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*) / H.C. Scholz, S. Revilla-Fernández, S. Al Dahouk, J.A. Hammerl, M.S. Zygmunt, A. Cloeckaert Witte // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2016. – Vol. 66. – №. 5. – P. 2090-2098.
134. Šedo, O. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria / O. Šedo, I. Sedláček, Z. Zdráhal // *Mass spectrometry reviews.* – 2011. – Vol. 30. – №. 3. – P. 417-434.
135. Shaw, E.I. Identification of Biomarkers of Whole *Coxiella burnetii* Phase I by MALDI-TOF Mass Spectrometry / E. I. Shaw, H. Moura, A. R. Woolfitt, M. Ospina, H. A. Thompson, J. R. Barr // *Analytical chemistry.* – 2004. – Vol. 76. – №. 14. – P. 4017-4022.
136. Skerman, V.B.D. Approved Lists of Bacterial Names / V.B.D. Skerman, V. McGowan, P.H.A. Sneath // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1980. – Vol. 30. – P. 225-420.
137. Soleimani, M. Developing a real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification assay as a rapid and accurate method for detection of Brucellosis / M. Soleimani, S. Shams, A.K. Majidzadeh // *J. Appl. Microbiol.* – 2013. – Vol. 115. – P. 828-834
138. Suarez, S. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory / S. Suarez, A. Ferroni, A. Lotz, K.A. Jolley, P. Guérin, J. Leto, J. Armengaud // *Journal of microbiological methods.* – 2013. – Vol. 94. – №. 3. – P. 390-396.
139. Suarez, C.E. Characterization of *Brucella ovis* surface antigens / C.E. Suarez, G.A. Pacheco, A.M. Vigliocco // *J. Vet. Microbiol.* – 1988. – Vol. 18. – № 3-4. – P. 349-356.
140. Suh, M.J. Investigation of methods suitable for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes / M. J. Suh, P. A. Limbach // *European journal of mass spectrometry.* – 2004. – Vol. 10. – №. 1. – P. 89-99.
141. Sun, L. Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of *Lactobacillus plantarum* / L. Sun, K. Teramoto, H. Sato, M. Torimura, H. Tao, T. Shintani // *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry.* – 2006. – Vol. 20. – №. 24. – P. 3789-3798.
142. Surucuoglu, S. Evaluation of real time PCR method for rapid diagnosis of brucellosis with different clinical manifestations / S. Surucuoglu, S. El, S. Ural, H. Gazi, S. Kurutepe, P. Taskiran, S.G. Yurtsever // *Pol. J. Microbiol.* – 2009. – Vol. 58. - P. 15-19.

143. Tabasi, M. Development of an indirect ELISA based on whole cell *Brucella abortus* S99 lysates for detection of IgM anti-*Brucella* antibodies in human serum / M. Tabasi, S. Eybpoosh, S. Bouzari //Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. – 2019. – Vol. 63. – P. 87-93.
144. Tanaka, K. Nobel Laureates in chemistry [Электронный ресурс]/ К. Tanaka, J.B. Fenn 2002. – Режим доступа: <http://www.nobelprize.org> (дата обращения 01.01.2020).
145. Tanaka, K. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization timeofflight mass spectrometry /К. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo //Rapid communications in mass spectrometry. – 1988. – Vol. 2. – №. 8. – P. 151-153.
146. The Centers for Disease Control and Prevention. Risks from Unpasteurized Dairy Products. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cdc.gov/brucellosis/exposure/drug-resistant-brucellosis-linked-raw-milk.html> (дата обращения 01.03.2020).
147. Trimpin S. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry method for selectively producing either singly or multiply charged molecular ions /Trimpin S., Inutan E.D., Herath T.N., McEwen C.N.//Analytical chemistry. – 2010. – Vol. 82. – №. 1. – P. 11-15.
148. Trimpin, S. A mechanism for ionization of nonvolatile compounds in mass spectrometry: considerations from MALDI and inlet ionization /S. Trimpin, B. Wang, E.D. Inutan, J. Li, C.B. Lietz, A. Harron, V.S. Pagnotti, D. Sardelis, C.N. McEwen//Journal of the American Society for Mass Spectrometry. – 2012. – Vol. 23. – №. 10. – P. 1644-1660.
149. van Belkum, A. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: what are the current issues? / A. Van Belkum, M. Welker, D. Pincus, J.P. Charrier, V. Girard //Annals of laboratory medicine. – 2017. – Vol. 37. – № 6. – P. 475-483.
150. Verger, J.M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization / J.M. Verger, F. Grimont, P.A.D. Grimont, M. Grayon // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1985. – Vol. 35. – P. 292-295.
151. Vergnaud, G. Genotypic Expansion Within the Population Structure of Classical *Brucella* Species Revealed by MLVA16 Typing of 1404 *Brucella* Isolates from Different Animal Geographic Origins, 1974–2006 / G. Vergnaud, Y. Hauck, D. Christiany, B. Daoud, C. Pourcel, I. Jacques, M.S. Zygmunt// Frontiers in Microbiology. - 2018. – Vol. 9. – P. 1545.
152. Vila, A. *Brucella suis* bacteremia misidentified as *Ochrobactrum anthropi* by the VITEK 2 system / A. Vila, H. Pagella, Bello G. Vera, A. Vicente //The Journal of Infection in Developing Countries. – 2016. – Vol. 10. – №. 04. – P. 432-436.
153. Vitry, M.A. *Brucella melitensis* invades murine erythrocytes during infection / M.A. Vitry, D.H. Mambres, M. Deghelt, K. Hack, A. Machelart, F. Lhomme, J.J. Letesson //Infection and immunity. – 2014. – Vol. 82. – №. 9. – P. 3927-3938.

154. Wang, P., Misidentification of *Brucella* spp. from blood culture / P. Wang, H. Li, J.L. Xu //Reviews in Medical Microbiology. – 2016. – Vol. 27. – №. 2. – P. 47-49.
155. Wang, Z. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics / Z. Wang, M. Gerstein, M. Snyder // Nat. Rev. Genet. – 2009. – Vol. 10 (1). – P. 57-63.
156. Weir D. M. et al. Handbook of experimental immunology //Handbook of experimental immunology. – 1967.
157. Whatmore, A.M. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.) / A.M. Whatmore, N. Davison, A. Cloeckert, S. Al Dahouk, M.S. Zygmunt, S.D. Brew, H.C. Scholz // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2014. – Vol. 64. – P. 4120-4128.
158. Whatmore, A.M. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing / A.M. Whatmore, L.L. Perrett, A.P. MacMillan // BMC Microbiol. – 2007. –Vol. 7. – P. 34.
159. Whatmore, A.M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens / A.M. Whatmore // Infect Genet Evol. – 2009. – Vol. 9. – P. 1168-1184.
160. Whatmore, A.M. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*) / A.M. Whatmore, E.J. Dale, E. Stubberfield, J. Muchowski, M. Koylass, C. Dawson, A. Lawrie //JMM Case Reports. – 2015. – Vol. 2. – №. 1. – P. 1-5.
161. Wilkins, C.L. Identification of microorganisms by mass spectrometry. /C.L. Wilkins, J.O. Lay // Chemical analysis. A series of monographs on analytical Chemistry and its applications (Edited by J.D. Winefordner) -John Wiley & Sons. – 2006. – P. 169 P.
162. Wittwer, M. Tapping the potential of intact cell mass spectrometry with a combined data analytical approach applied to *Yersinia* spp.: detection, differentiation and identification of *Y. pestis* /M. Wittwer, J. Heim, M. Schär, G. Dewarrat, N. Schürch // Syst. Appl. Microbiol. – 2011. – Vol. 34. – №. 1. – P. 12-19.
163. Yang, J. Mistaken identity of *Brucella* infection / J. Yang, X.Q. Ren, M.L. Chu, D.Y. Meng, W.C. Xue //Journal of clinical microbiology. – 2013. – Vol. 51. – №. 6. – P. 2011-2011.
164. Yilma, M. Review on brucellosis sero-prevalence and ecology in livestock and human population of Ethiopia /M. Yilma, G. Mamo, B. Mammo //Achievements in the Life Sciences. – 2016. – Vol. 10. – №. 1. – P. 80-86.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Публикации в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований:**

1. **Ульшина, Д.В.** Разработка алгоритма идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, О.В. Бобрышева, Г.И. Лямкин, А.А. Худолеев, Ю.В. Сирица, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 4. – С. 96-99. (Импакт-фактор РИНЦ 0,464)

2. **Ульшина, Д.В.** Особенности масс-спектрометрических белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза при подготовке культуры на разных питательных средах / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, А.М. Жиров, Н.В. Жаринова, А.А. Худолеев, О.И. Коготкова, В.И. Ефременко, Н.И. Евченко, А.Н. Куличенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 1. – С. 29-34. (Импакт-фактор РИНЦ 0,464)

3. **Ульшина, Д.В.** Применение времяпролетной масс-спектрометрии для выявления возбудителя бруцеллеза в образцах крови в эксперименте / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова, Н.М. Швецова, Т.В. Таран, И.В. Кузнецова, А.М. Жиров, А.А. Хачатурова, И.Ю. Борздова, А.Н. Куличенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 4. – С. 9–17. (Импакт-фактор РИНЦ 0,464)

4. **Ульшина, Д.В.** Применение времяпролетной масс-спектрометрии для диагностики бруцеллеза и межвидовой дифференциации штаммов *Brucella* spp. / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, О.В. Бобрышева, Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова, Н.И. Ковалева, А.Н. Куличенко // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2018. – Т. 7, № 4 (27). – С. 15–24. (Импакт-фактор РИНЦ 0,325)

5. **Ульшина, Д.В.** Масс-спектрометрический анализ белковых экстрактов крови животных при экспериментальном бруцеллезе / Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова, Т.В. Бердникова, А.Ю. Евченко, О.В. Бобрышева, Ю.В. Сирица, С.В. Писаренко, А.М. Жиров, И.В. Кузнецова, Н.Г. Варфоломеева, А.Н. Куличенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 4. – С. 11–18. (Импакт-фактор РИНЦ 0,464)

### **Базы данных:**

1. База данных РФ № 2016620345, от 15.03.2016. Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper / ...Воропаев В.В., Котенева Е.А., Еременко Е.И., Аксенова Л.Ю., Рязанова А.Г., Цыганкова О.И., **Ульшина Д.В.** и др. – Правообладатели: ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и др.

2. База данных РФ №2017621336, от 20.11.2017. База референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI BioTyper / **Ульшина Д.В.**, Ковалев Д.А., Кузнецова И.В., Жиров А.М., Бобрышева О.В. и др. – Правообладатель ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.



### Публикации в других изданиях:

1. Ковалев, Д.А. Времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией как современный метод анализа микроорганизмов / Д.А. Ковалев, Д.В. Ульшина, И.В. Кузнецова // Бактериология. – 2018. – № 1. – С. 13–17.

### Публикации в сборниках трудов и материалов научных конференций:

1. Ульшина, Д.В. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации *Brucella* spp. / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, С.И. Головнева, Е.В. Чеботарева // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международ. участием «Актуальные вопросы обеспечения противоэпидемических мероприятий в зоне чрезвычайных ситуаций» // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2014. - № 25. – С. 111-113.

2. Ульшина, Д.В. Разработка алгоритма идентификации *Brucella* spp. с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии / Д. В. Ульшина, Д. А. Ковалев, С. И. Головнева, Г. И. Лямкин // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: матер. VI Всероссийской науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, 22-24 октября 2014 г., г. Ставрополь. – Ставрополь: Экспо-Медиа, 2014. – С. 112-113.

3. Ульшина, Д.В. Использование прямого белкового профилирования с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации и типирования *Brucella* spp. / Д. В. Ульшина, Д. А. Ковалев, С. И. Головнева, Н. И. Ковалева, В. В. Воропаев // Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения: матер. Всероссийской науч.-практ. конф. (28 мая 2014 г.) / под ред. Е.И. Ефимова. – Н. Новгород, 2014. – С. 123-127.

4. Ульшина, Д.В. Изучение особенностей белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза при культивировании на разных питательных средах / Ульшина Д.В., Ковалев Д.А. Худолеев А.А. // Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: матер. международ. конф. (23-24 июня 2015 г., Москва). – М., 2015. – С. 387-390.

5. Ульшина, Д.В. Сравнительный анализ результатов белкового профилирования культур возбудителя бруцеллеза при использовании различных питательных сред / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, А.Н. Куличенко // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: сб. тр. VII Всеросс. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, 08-10 декабря 2015 г. - СПб., 2015. – С.

6. Ульшина, Д.В. Определение маркеров возбудителя бруцеллеза в крови методом времяпролетной масс-спектрометрии / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, А.Н. Куличенко // Здоровье населения и среда обитания: матер. науч.-практ. конф. 20-я ежегод. Неделя медицины Ставрополя. – Ставрополь: Параграф, 2016. – С. 101–104.

7. Ульшина, Д.В. Выявление возбудителя бруцеллеза в крови методом времяпролетной масс-спектрометрии / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, А.Н. Куличенко // Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе: матер. науч.-практ. конф., Новосибирск, 26–27 сентября 2016 г. – Новосибирск: АРЕАЛ, 2016. – С. 174–176.

8. Ульшина, Д.В. Поиск маркеров возбудителя бруцеллеза в крови с использованием метода MALDI-TOF MS / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, А.Н. Куличенко

// Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: матер. VIII Всеросс. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, Москва, 1–3 ноября 2016 г. – М.: Грифон, 2016. – С. 217–219.

9. **Ульшина, Д.В.** Изучение особенностей белковых профилей крови больных бруцеллезом людей с использованием MALDI-TOF MS / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных [Электронный ресурс]: материалы II Всероссийской научно-практической конференции / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь, 2017. – С. 283–285

10. **Ульшина, Д.В.** Анализ результатов MALDI-TOF MS исследования проб крови больных бруцеллезом людей / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова // Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения: матер. всеросс. науч.-практ. интернет-конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора / под ред. проф. А.Ю. Поповой, акад. РАН Н.В. Зайцевой. – Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2017. – С. 246–249.

11. **Ульшина, Д.В.** Использование MALDI-TOF MS для выявления особенностей белковых профилей крови больных бруцеллезом людей: [по матер. XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения», Москва, 16–17 ноября, 2017 г.] / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № 5. – С. 1027. (Импакт-фактор РИНЦ: 0,745)


12. Ковалев, Д.А. Времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией как современный метод анализа микроорганизмов / Д.А. Ковалев, **Д.В. Ульшина**, И.В. Кузнецова // Бактериология. – 2018. – № 1. – С. 13–17.

13. **Ульшина, Д.В.** Белковое профилирование экстрактов крови больных бруцеллезом людей методом MALDI-TOF MS / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, И.В. Кузнецова, О.В. Бобрышева, С.В. Писаренко, Д.Г. Пономаренко, Т.В. Бердникова, А.Н. Куличенко // Молекулярная диагностика 2018: сб. тр. международной науч.-практ. конф. (Минск, 27–28 сентября 2018 г.) / под ред. В.И. Покровского. – Минск: СтройМедиаПроект, 2018. – С. 533–534.

14. **Ульшина, Д.В.** Применение прикладных пакетов в среде языка R для биоинформационной обработки данных MALDI-TOF на примере *Brucella* spp. и *Bacillus anthracis* / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, О.В. Семенова, А.Г. Рязанова, Л.Ю. Аксенова, Е.И. Еременко, О.В. Бобрышева, И.В. Кузнецова, Ю.В. Сирица, А.М. Жиров, Д.Г. Пономаренко, А.Н. Куличенко // Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ: матер. XIV Межгосударственной науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, 20–21 ноября 2018 г.). – Саратов: Амирит, 2018. – С. 386–388.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

База референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы  
MALDI BioTyper

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ		<b>RU</b>	<b><u>2017621336</u></b>
			
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ (12) ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ			
Номер регистрации (свидетельства): <a href="#">2017621336</a>  Дата регистрации: 20.11.2017  Номер и дата поступления заявки: 2017621026 22.09.2017  Дата публикации: <a href="#">20.11.2017</a>  Контактные реквизиты: <a href="mailto:snipchi@mail.stv.ru">snipchi@mail.stv.ru</a>	Авторы: Ульшина Диана Васильевна (RU), Ковалев Дмитрий Анатольевич (RU), Кузнецова Ирина Владимировна (RU), Жиров Андрей Михайлович (RU), Бобрышева Ольга Викторовна (RU), Пономаренко Дмитрий Григорьевич (RU), Русанова Диана Владимировна (RU), Ковалева Нина Ивановна (RU), Жилченко Елена Борисовна (RU), Жаринова Нина Вадимовна (RU), Рязанова Алла Геннадиевна (RU), Таран Татьяна Викторовна (RU), Швецова Наталья Михайловна (RU), Борздова Ирина Юрьевна (RU)  Правообладатель: Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно- исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора) (RU)		
Название базы данных: <b>« База референсных масс - спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI BioTyper »</b>			
<b>Реферат:</b> База данных предназначена для накопления и хранения 96 масс - спектров экстрактов основных рибосомальных белков штаммов <i>Brucella spp.</i> ( <i>Brucella abortus</i> , <i>Brucella melitensis</i> , <i>Brucella canis</i> , <i>Brucella neotomae</i> , <i>Brucella ovis</i> , <i>Brucella suis</i> ), циркулировавших в Ставропольском крае, Республиках Дагестан, Ингушетия, Чечня, Кабардино-Балкария, Северная Осетия - Алания и Калмыкия, полученных методом MALDI -TOF MS. База данных позволяет проводить видовую идентификацию бруцелл в режиме реального времени на основе библиотеки референсных масс - спектров , пополнение базы данных новыми масс - спектрами , редактирование полученных MSP, а также построение таксономических деревьев. База масс - спектров штаммов возбудителя бруцеллеза создана на платформе программы MALDI Biotyper и может быть использована совместно с базой данных Bruker Daltonics. Данные систематизированы по видам возбудителя .			
Тип реализующей ЭВМ: IBM PC-совмест. ПК			

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**RU**

**2016620345**

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
(12) ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ

Номер регистрации (свидетельства):  
[2016620345](#)

Дата регистрации: 15.03.2016

Номер и дата поступления заявки:  
2016620044 19.01.2016

Дата публикации: [20.04.2016](#)

Авторы:

Абдрашитова Адия Сабержановна (RU),  
Щербакова Наталья Евгеньевна (RU),  
Спицын Алексей Николаевич (RU),  
Касьян Жанетта Андреевна (RU),  
Сеничкина Айслу Мухамятовна (RU),  
Портенко Светлана Анатольевна (RU),  
Куклев Василий Евгеньевич (RU),  
Уткин Денис Валерьевич (RU),  
Осина Наталия Александровна (RU),  
Щербакова Светлана Анатольевна (RU),  
Воропаев Владимир Владимирович (RU),  
Котенева Елена Анатольевна (RU),  
Еременко Евгений Иванович (RU),  
Аксенова Людмила Юрьевна (RU),  
Рязанова Алла Геннадьевна (RU),  
Цыганкова Ольга Ивановна (RU),  
Ульшина Диана Васильевна (RU),  
Ковалев Дмитрий Анатольевич (RU),  
Писаренко Сергей Владимирович (RU),  
Худолесев Антон Алексеевич (RU),  
Хачатурова Анна Андреевна (RU),  
Жаринова Нина Вадимовна (RU),  
Лямкин Геннадий Иванович (RU),  
Куличенко Александр Николаевич (RU),  
Афанасьев Максим Владимирович (RU),  
Миронова Лидия Валерьевна (RU),  
Остяк Александр Сергеевич (RU),  
Вдовиченко Галина Владимировна (RU),  
Токмакова Елена Геннадьевна (RU),  
Куликалова Елена Станиславовна (RU),  
Татарников Станислав Александрович (RU),  
Басов Евгений Александрович (RU),  
Балахонов Сергей Владимирович (RU),  
Чемисова Ольга Сергеевна (RU),  
Сагакиц Маргарита Мардиросовна (RU),  
Полеева Марина Владимировна (RU),  
Детушев Константин Владимирович (RU),  
Русанова Диана Владимировна (RU),  
Благодатских Станислав Александрович (RU),

## Продолжение Приложения Б

08.09.2020	<p style="text-align: center;">БД №2016620345</p> <p>Топорков Андрей Владимирович (RU),  Викторов Дмитрий Викторович (RU),  Шаров Тимур Николаевич (RU),  Лопастейская Яна Анатольевна (RU),  Молчанова Елена Владимировна (RU),  Захарова Ирина Борисовна (RU),  Маркин Александр Михайлович (RU)</p> <p>Правообладатели:  Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора) (RU)  Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора) (RU)  Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) (RU)  Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора) (RU)  Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора) (RU)  Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) (RU)</p>
------------	---

## Продолжение Приложения Б

08.09.2020

БД №2016620345

Название базы данных:

**Белковые профили масс - спектров микроорганизмов I - II групп патогенности для программы MALDI Biotyper**

**Реферат:**

База данных предназначена для систематизации, анализа и хранения информации о белковых масс - спектрах 148 штаммов микроорганизмов I - II групп патогенности, включающих виды: *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis*, *Burkholderia mallei*, *B. pseudomallei*, полученных методом MALDI -TOF масс-спектрометрии. База данных позволяет проводить идентификацию и таксономическую классификацию до вида указанных бактерий и является дополнением к базе данных Bruker Daltonics программы MALDI Biotyper. Систематизация материалов выполнена по таксономическому признаку по родам, видам и подвидам.

**Тип реализующей ЭВМ:** IBM PC-совмест. ПК

**Вид и версия системы управления базой данных:** MALDI Biotyper (Bruker Daltonics)

**Вид и версия операционной системы:** Windows XP/7

**Объем базы данных:** 2,94 Мб