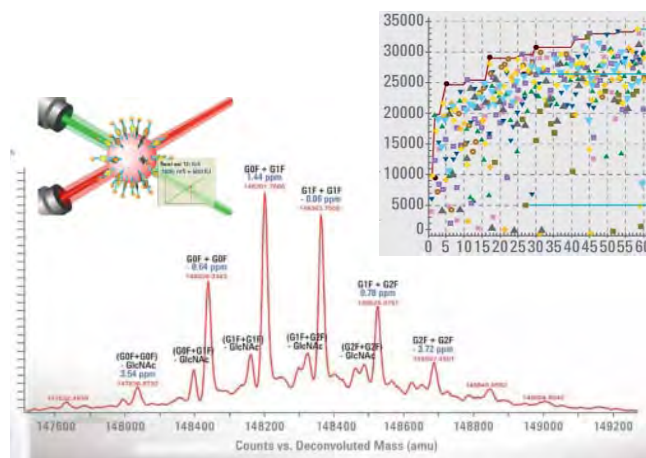


Применение масс-спектрометрии для выявления и идентификации патогенных микроорганизмов и биотоксинов

Масс-спектрометрия выявляет микробиологические патогены на уровне рода в 97–99% случаев и на уровне вида – в 85–97%. Особо следует отметить поиск факторов патогенности в отсутствие микроорганизмов, их синтезировавших (токсины и микотоксины), а также прионов и рицина (или ему подобных). В случае белковых токсинов, которые действуют как ферменты (ботулинические всех типов, летальный фактор сибирской язвы, рицин и т.п.), могут быть использованы синтетические или клонированные и экспрессированные субстраты, по деструкции которых достаточно эффективно можно определять их наличие в образцах от больных или зараженных животных. Так, в большинстве случаев ботулизма разных типов (за исключением А) чувствительность MALDI TOF-анализа сопоставима с чувствительностью мышинной модели.



В случае небольших молекул, таких как микотоксины, либо прионов необходимо применять высокоаффинные молекулы, например антитела или аптамеры. Принципы определения взаимодействия антител (аптамеров) с микотоксинами или прионами могут быть самыми разнообразными – от иммуноферментного анализа и до иммуноаптамерной полимеразной цепной реакции (амплификационный анализ является самым высокочувствительным).

Важнейшая проблема определения спектра резистентности патогенных микроорганизмов к лекарственным средствам также может быть успешно решена с использованием время-пролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) с помощью анализа масс-спектров определенных микроорганизмов на наличие характерных паттернов резистентности, анализа индуцируемым бактериями гидролиза бета-лактамовых антибиотиков по изменению их массы после 30–180-минутной инкубации, определения аминокислотных остатков с меткой стабильными изотопами при росте бактерий в среде с антибиотиком, анализа бактериального роста в присутствии и отсутствии антибиотиков с использованием внутренних стандартов.

Золотым стандартным методом обнаружения активного ботулинического нейротоксина является постановка биопробы на животных. Для быстрого выявления и дифференциации ботулотоксинов был разработан аппаратный метод на основе использования масс-спектрометра Bruker MALDI-TOF MS Biotyper. Этот прибор широко применяется в российских лабораториях для идентификации выделенных культур. При прямом сравнении метода с биопробными мышами и использования масс-спектрометра Bruker MALDI для определения чувствительности анализа при выявлении ботулотоксинов А, В, Е, и F в эквивалентных концентрациях было показано, что для ботулотоксинов В, Е и F чувствительность масс-спектрометрического анализа была эквивалентной или лучше, чем при постановке биопро-

бы с разными значениями LD50. Ботулотоксин А был обнаружен в биопробе в более низких концентрациях, чем при масс-спектрометрии. При проведении сравнительных испытаний клинических образцов метод масс-спектрометрии быстро выявляет активность ботулотоксина и его серотипы в полном соответствии с результатами биопробы. Все это говорит о том, что анализ MS может генерировать надежные быстрые результаты, устраняя при этом необходимость тестирования на животных.

Еще одним патогенным биологическим агентом, имеющим значение в биологической безопасности, является рицин – высокотоксичный белок, который вызывает гибель клеток, блокируя синтез белка. Оперативное обнаружение малых концентраций токсина рицина в различных средах является актуальной и в то же время достаточно сложной задачей. Появились сообщения о выявлении активности рицина на основе *in vitro* MALDI TOF MS, который обнаруживает токсин посредством депурирования синтетического субстрата, специально разработанного для этих целей, оптимизации условий реакции и подготовкой образца. При этом рицин связывается со специфическими поликлональными антителами, полученными из гипериммунной сыворотки с последующим гидролизом комплекса антиген–антитело. Наличие рицина определяется в дальнейшем с помощью выявления уникального продукта расщепления синтетических олигомерных субстратов в масс-спектрометрическом анализе. Выявление депурированного субстрата было усилено с помощью более эффективного РНК-субстрата и оптимизации буферных компонентов, pH и температуры реакции, а также параметров самой масс-спектрометрии. Таким способом был достигнут предел обнаружения токсина, растворенного в молоке, равный 0,2 нг/мл, что превышает чувствительность традиционных методов более чем на два порядка. Эти разработки свидетельствуют о том, что масс-спектрометрия является одним из наиболее перспективных методов индикации опасных токсинов в биологических жидкостях.

Что касается практического использования, то MALDI-TOF MS является современным экспресс-методом детекции и в некоторых случаях дифференциации микроорганизмов дает возможность анализировать белковые экстракты микробной клетки, что существенно повышает возможности лабораторной диагностики и производительность труда в лабораториях. Чувствительность метода MALDI-TOF MS для разных бактериальных патогенов составляет от 10^3 до 10^6 микробных клеток в миллилитре, что позволяет проводить индикацию и идентификацию микроорганизмов. В настоящее время использование MALDI-TOF MS в лабораторной диагностике осуществляется путем сравнения полученных белковых профилей с базой данных референтных масс-спектров. Многие российские лаборатории оснащены типовыми приборами BioTyper (Bruker), которые широко используются для идентификации. База данных спектров в этих приборах достаточно широка, но охватывает из патогенных микроорганизмов только бактерии III–IV групп патогенности по национальной классификации и большое количество известных условно-патогенных и непатогенных бактерий. Это существенно затрудняет использование метода для решения оперативных вопросов в рамках санитарно-эпидемиологического надзора и биологической безопасности. Группой научных институтов Роспотребнадзора под эгидой РосНИПЧИ «Микроб» был создан банк масс-спектрометрических данных опасных бактерий I–II групп патогенности, позволяющий идентифицировать такие возбудители с использованием данного типа приборов. Это стало возможным благодаря тому, что данные приборы представляют собой системы открытого типа, базы данных которых могут быть дополнены новыми спектрами. Эта база данных внедрена в практическую работу научных институтов, осуществляющих функции центров индикации и диагностики в федеральных округах страны. В развитии этого направления в Ставропольском НИПЧИ проведен цикл работ по межвидовой дифференциации возбудителя бруцеллеза, для чего была создана электронная база референтных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза для идентификации и дифференциации изолятов *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*. Также впервые показана возможность выявления специфических маркеров возбудителя бруцеллеза в крови больных с острой формой заболевания методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры. Кроме того, на таком достаточно рутинном приборе (по сравнению с новейшими масс-спектрометрами высокого разрешения) удалось показать в некоторых случаях и штаммовые различия внутри одного вида бруцелл.

Все это говорит о высокой перспективности метода масс-спектрометрии для выявления и дифференциации патогенных бактерий.

Важность развития этого метода диагностики состоит в том, что он может эффективно использоваться в схемах выявления и дифференциации новых и вновь проявляющихся патогенов, когда для прогнозирующих программ важны множественные данные о свойствах выделенного возбудителя. В этой связи в разрабатываемый ГНЦ ПМБ (Оболенск) «Национальный интерактивный каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов» будут включены в раздел свойств патогена, как признак дифференциации, данные о масс-спектрометрических свойствах. Это позволит существенно расширить возможности поисковой системы каталога при выявлении и определении территориальной приуроченности (происхождения) патогена, а также использовать эти данные в сочетании с другими для определения в образце совершенного нового возбудителя опасного заболевания.

Наибольшую озабоченность вызывает отсутствие собственных приборов для масс-спектрометрического анализа в России, хотя именно здесь 30–40 лет назад были разработаны основные подходы к использованию масс-спектрометрии для диагностики и даже созданы действующие лабораторные образцы. В последнее время наметились некоторые тенденции в создании таких отечественных приборов в рамках обеспечения технологической независимости, и наиболее рациональным представляется создание компактных масс-спектрометрических идентификаторов, использующих российские базы данных микроорганизмов и токсинов, которыми могут быть оснащены практические клинично-диагностические лаборатории.

Для крупных научных учреждений, осуществляющих референтные функции, являющихся центрами индикации и диагностики патогенных биологических агентов, осуществляющих фундаментальные исследования в области молекулярных взаимодействий «патоген–хозяин» и прикладные разработки новых диагностических, профилактических и терапевтических средств, необходимо оснащение высокочувствительными прецизионными масс-спектрометрами, позволяющими автоматически подтверждать последовательность аминокислот в белке путем картирования пептидов, определять основные и второстепенные продукты реакций с высокой чувствительностью, автоматически количественно выявлять значимые интактные белки моноклональных антител, дифференцировать ключевые гликопептиды, анализировать белки клетки-хозяина, идентифицировать определенные токсины биологического происхождения в тканях макроорганизма и др.

Таким образом, развитие масс-спектрометрии является важным направлением в обеспечении биологической безопасности страны, обеспечивая эффективность клинично-диагностической деятельности, существенное повышение интенсивности и качества научных разработок по созданию новых средств диагностики, профилактики и лечения опасных инфекционных болезней.

*Директор ФБУН «Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
академик РАН И.А.Дятлов*