

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА, УСТОЙЧИВЫХ К ВОЗДЕЙСТВИЮ РАЗЛИЧНЫХ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ

MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF STRAINS OF GLANDERS AND MELIOIDOSIS AGENT RESISTANT TO VARIOUS DISINFECTANTS

T. Sharov
D. Luchinin
E. Molchanova

Summary. The article is devoted to the study of the effect on the mass spectra of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* strains of artificially formed resistance to widely used disinfectants: hydrogen peroxide, chloramine B, benzalkonium chloride, as well as glutaraldehyde. The aim of the work was to assess the changes that occur during the formation of resistance to certain substances in the pool of general cellular proteins of microorganism, as well as the relevance of replenishing the database with mass spectra of strains resistant to the described disinfectants. The study used 14 strains of pathogenic burkholderia, as well as disinfectant-resistant variants of these strains. 70 individual mass spectra were obtained and processed. A cluster analysis was carried out using the Saramis Premium software. It has been established that during the formation of resistance to disinfectants, the totality of general cellular proteins changes sufficiently to influence the results of automatic identification by mass spectrometry. All the original strains were successfully identified to the species level, and among the strains with resistance, only 40 % were able to successfully identify the species. The principal possibility of using the MALDI-TOF mass spectrometry method for the identification of strains of pathogens of glanders and melioidosis with different sensitivity to disinfectants is shown.

Keywords: microbiology, resistance, mass spectrometric analysis, intracellular proteins.

Шаров Тимур Николаевич

канд. мед. наук,

с.н.с. лаборатории протеомного анализа,
ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора
timursharov@gmail.com

Лучинин Дмитрий Николаевич

с.н.с. лаборатории арбовирусных инфекций,
ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора
luchinin.dmitrii@yandex.ru

Молчанова Елена Владимировна

канд. биол. наук,
с.н.с. лаборатории арбовирусных инфекций,
ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора
unicorn54@mail.ru

Аннотация. Статья посвящена изучению влияния на масс-спектры штаммов *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei* искусственно сформированной резистентности к широко применяемым дезинфектантам: перексиду водорода, хлорамину В, бензалкония хлориду, а также глutarовому альдегиду. Целью работы была оценка изменений, возникающих при формировании резистентности к тем, или иным веществам в пуле общеклеточных белков микроорганизма, а также актуальность пополнения базы данных масс-спектрами штаммов, резистентных к описанному дезинфицирующим средствам. В исследовании были использованы 14 штаммов патогенных буркхольдерий, а также устойчивые к дезинфицирующим средствам варианты этих штаммов. Было получено и обработано 70 индивидуальных масс-спектров. Проведён кластерный анализ с помощью программного обеспечения «Saramis Premium». Установлено, что при формировании устойчивости к дезинфицирующим средствам, совокупность общеклеточных белков меняется в достаточной степени, чтобы влиять на результаты автоматической идентификации методом масс-спектрометрии. Все исходные штаммы успешно идентифицировались до уровня вида, а среди штаммов с резистентностью успешно определить вид удалось только у 40 %. Показана принципиальная возможность использования метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза с различной чувствительностью к дезинфицирующим средствам.

Ключевые слова: микробиология, резистентность, масс-спектрометрический анализ, внутриклеточные белки.

Введение

Мелиоидоз и сап — опасные болезни человека и животных, возбудители которых, бактерии рода буркхольдерий *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*, относятся ко второй группе пато-

генности. Не смотря на расширение ареала территорий, на которых выявляют случаи заболевания мелиоидозом на планете, в Российской Федерации мелиоидоз не регистрировался. Эпизоотии сапа периодически отмечают в Монголии, Иране, Ираке, Турции и ряде других стран. Необходимость изучения *B. pseudomallei* и *B. mallei* и вы-

зываемых ими заболеваний вызвана опасностью их заноса из эндемичных регионов. Классическая микробиологическая идентификация патогенных буркхольдерий включает проведение фенотипических тестов, при этом на получение результатов требуется до 72 ч с момента поступления первичного материала. Внедрение в бактериологическую практику новых автоматизированных лабораторных методов исследования позволяет проводить изучение полученных изолятов микроорганизмов на молекулярном уровне, существенно ускорять и упрощать процесс диагностики. Времяпролётная масс-спектрометрия занимает особую нишу в бактериологии и клинической лабораторной практике и зарекомендовала себя как надёжный и быстрый метод идентификации микроорганизмов как в чистой культуре, так и в биологических жидкостях или образцах внешней среды. Однако точность определения вида или рода микроорганизма в значительной степени зависит не только от технических характеристик масс-анализаторов, но и от наполненности баз данных референтными масс-спектрами, в том числе с различной устойчивостью к веществам с бактерицидной активностью [1]. В настоящее время одной из актуальных проблем в клинической бактериологии представляется идентификация штаммов микроорганизмов, с приобретённой резистентностью к антибиотиками или бактерицидным веществам [2, 3]. Целью данного исследования являлась оценка изменений в белковом составе клеток различных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, обладающих резистентностью к наиболее широко применяемым дезинфицирующим средствам и апробация применения метода времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации для их идентификации.

Материалы и методы

Штаммы, используемые в работе. В исследовании были использованы 14 штаммов патогенных буркхольдерий, а также их варианты, выращиваемые на питательной среде с добавлением дезинфицирующих средств (ДС). Культивирование проводили при температуре 37 °С в течение 18–72 часов на агаре Мюллера — Хинтона (Himedia, Индия). Принадлежность штаммов к видам *B. mallei* или *B. pseudomallei* подтверждена методом ПЦР. Дезинфектанты, применяемые для формирования резистентности включали в себя алкилдиметилбензиламмония хлорид (АДБАХ, бензалкония хлорид, катамин) (Sigma-Aldrich, США), глутаровый альдегид (ГА) (Carl Roth, Германия), хлорамин Б (ХБ) (Bochimie, Чехия), водорода перекись медицинская (пероксид водорода, ПВ) (ООО «Инновация», Россия). Для селекции резистентных вариантов штаммы возбудителя пассировали на плотной питательной среде (агар Мюллера-Хинтон) с добавлением одного из четырех дезинфектантов в повышающихся концентрациях. исследуемую культуру рассеивали

до изолированных колоний на агаре Мюллера-Хинтон с добавлением ингибирующего агента в количестве, равном минимальной подавляющей концентрации (МПК), и инкубировали при температуре 37 °С 48–72 часа. Выросшие клоны пересевали на плотную питательную среду с добавлением дезинфектанта в возрастающей концентрации. [4]. MALDI-ToF MS. Перед проведением масс-спектрометрического анализа бактериальную массу предварительно обеззараживали, а клеточные белки экстрагировали. Для этого применяли метод пробоподготовки с использованием муравьиной кислоты и ацетонитрила [5]. Полученный материал наносили на лунки металлической мишени (чипа) в объёме 1 мкл. Далее каждую пробу наносили по 1 мкл матрицы (α-цианогидроксикоричная кислота в растворе 50 % ацетонитрила и 2,5 % трихлоруксусной кислоты). После кристаллизации проб мишень с образцами помещали в камеру масс-спектрометра. Для калибровки прибора использовались клетки штамма *E. coli* CCUG 10979.

Результаты

В результате проведённых исследований устойчивость у *B. mallei* и *B. pseudomallei* удалось сформировать только к АДБАХ. Так, произошло увеличение МПК для данного дезинфекционного агента от 6,2 до 19,7 раза (в зависимости от штамма возбудителя). Резистентность к глутаровому альдегиду, хлорамину Б и пероксиду водорода сформировать не удалось. Однако, все штаммы находились под воздействием ингибирующего действия ДС в течение 15 недель, что могло привести к изменениям в белковых спектрах, и, как следствие, повлиять на их идентификацию методом времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации.

Все исследуемые варианты штаммов возбудителей мелиодоза и сапа были разделены на 5 групп: исходные штаммы (группа №1), штаммы, устойчивые к действию АДБАХ (группа №2), штаммы, выращиваемые на среде с добавлением пероксида водорода (группа №3), хлорамин Б (группа №4) и глутарового альдегида (группа №5). Для всех групп были получены стабильно воспроизводимые характеристические масс-спектры. Проведён кластерный анализ с помощью программного обеспечения «Saramis Premium», а также сопоставление с базой данных масс-спектров SARAMIS. Для удобства отображения пиков, в программе «Mmass» построены псевдогели, соответствующие масс-спектрам исследованных групп штаммов (рис. 1).

Как видно из рисунка 1, значительная часть пиков высокой и средней интенсивности является общей для рода *Burkholderia*. Пики с m/z 2579, 4062, 4434, 4805, 5230, 6212, 6531, 7195, 7301, 7566, 8097, 8124, 9600, а также 9982 являются общими для исследованных штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Три из них (4805, 8124, 9600) яв-

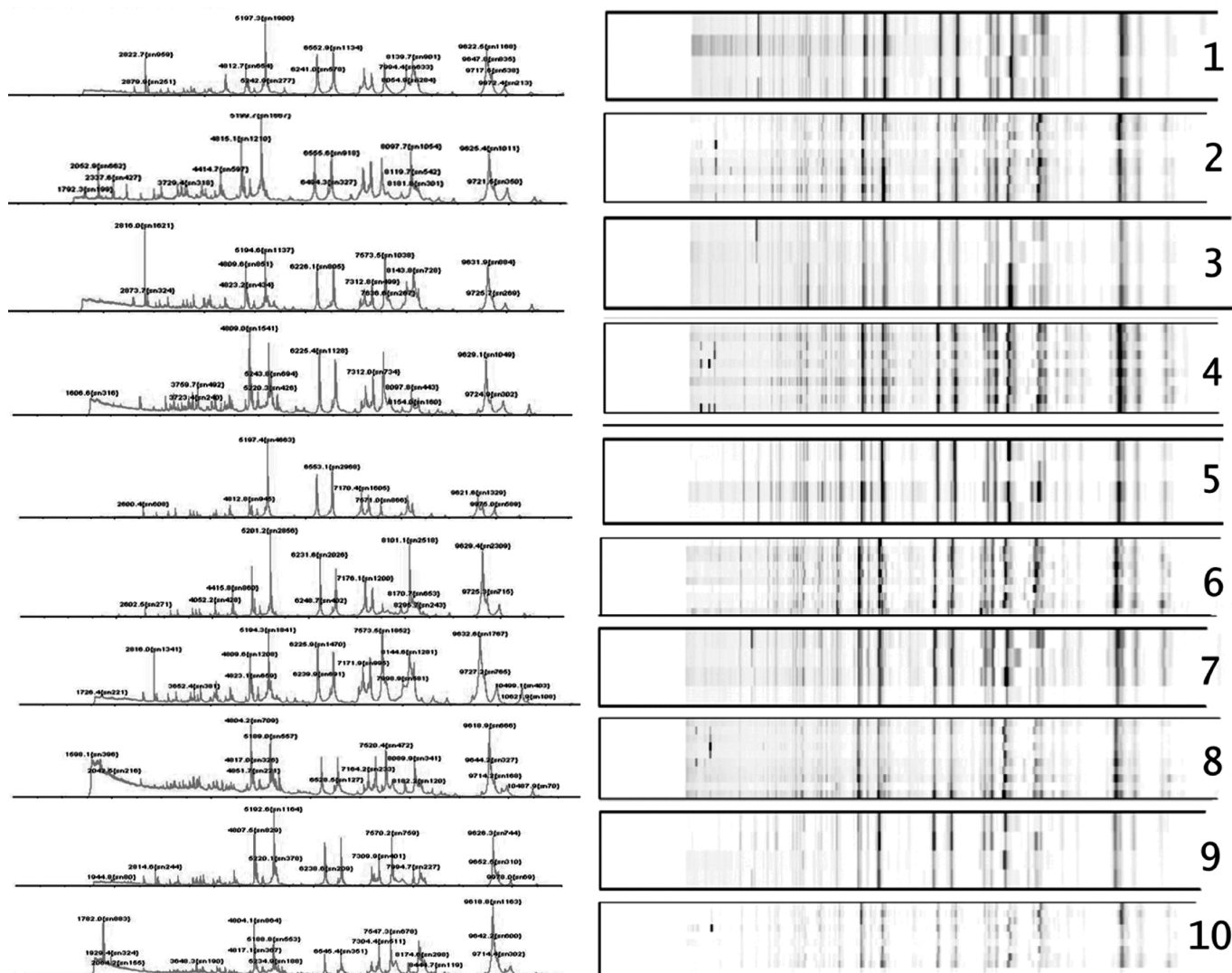


Рис. 1. Справа представлены псевдогели белковых спектров на основе совокупностей всех штаммов в группе. 1 — исходные штаммы *B. mallei*, 2 — исходные штаммы *B. pseudomallei*, 3 — штаммы *B. mallei* с резистентностью к глутаральдегиду, 4 — *B. pseudomallei* с резистентностью к глутаральдегиду, 5 — штаммы *B. mallei* с резистентностью к катамину, 6 — штаммы *B. pseudomallei* с резистентностью к катамину, 7 — штаммы *B. mallei* с резистентностью к хлорамину, 8 — штаммы *B. pseudomallei* с резистентностью к хлорамину, 9 — штаммы *B. mallei* с резистентностью к пероксиду водорода, 10 — штаммы *B. pseudomallei* с резистентностью к пероксиду водорода. Слева — соответствующие этим группам наиболее типичные масс-спектры из исследованных штаммов с различной резистентностью

ляются высокоинтенсивными у большинства штаммов, четыре (5230, 6212, 6531, 7566) имеют высокую или среднюю интенсивность, а остальные шесть обладают преимущественно низкой интенсивностью. Все масс-спектры разделились на три основных кластера, имеющие 61 % общих массовых пиков с одинаковым показателем m/z . Первый кластер был представлен 26 штаммами, из которых 11 относились к группе исходных штаммов, 8 — к группе резистентных к пероксиду, 7 — к группе устойчивых к катамину вариантов. (рис. 2).

Второй и самый крупный кластер включал 40 штаммов: 28 устойчивых к хлорамину и глутаральдегиду, 4

устойчивых к пероксиду водорода, 7 устойчивых к катамину, а также 1 исходный штамм (рис. 2).

Третий кластер был самым малым и состоял из 4 штаммов возбудителя сапа, по 2 из группы устойчивых к пероксиду и исходных, соответственно (рис. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что лишь штаммы устойчивые к хлорамину и глутаральдегиду попали в один кластер, остальные же три группы, включая исходные варианты распределились по разным кластерам. Средний показатель сходства в первой группе составлял 70 %, во второй — 65 %, в третьей — свыше 90 %. После сравнения с референтными масс-спектрами из базы данных

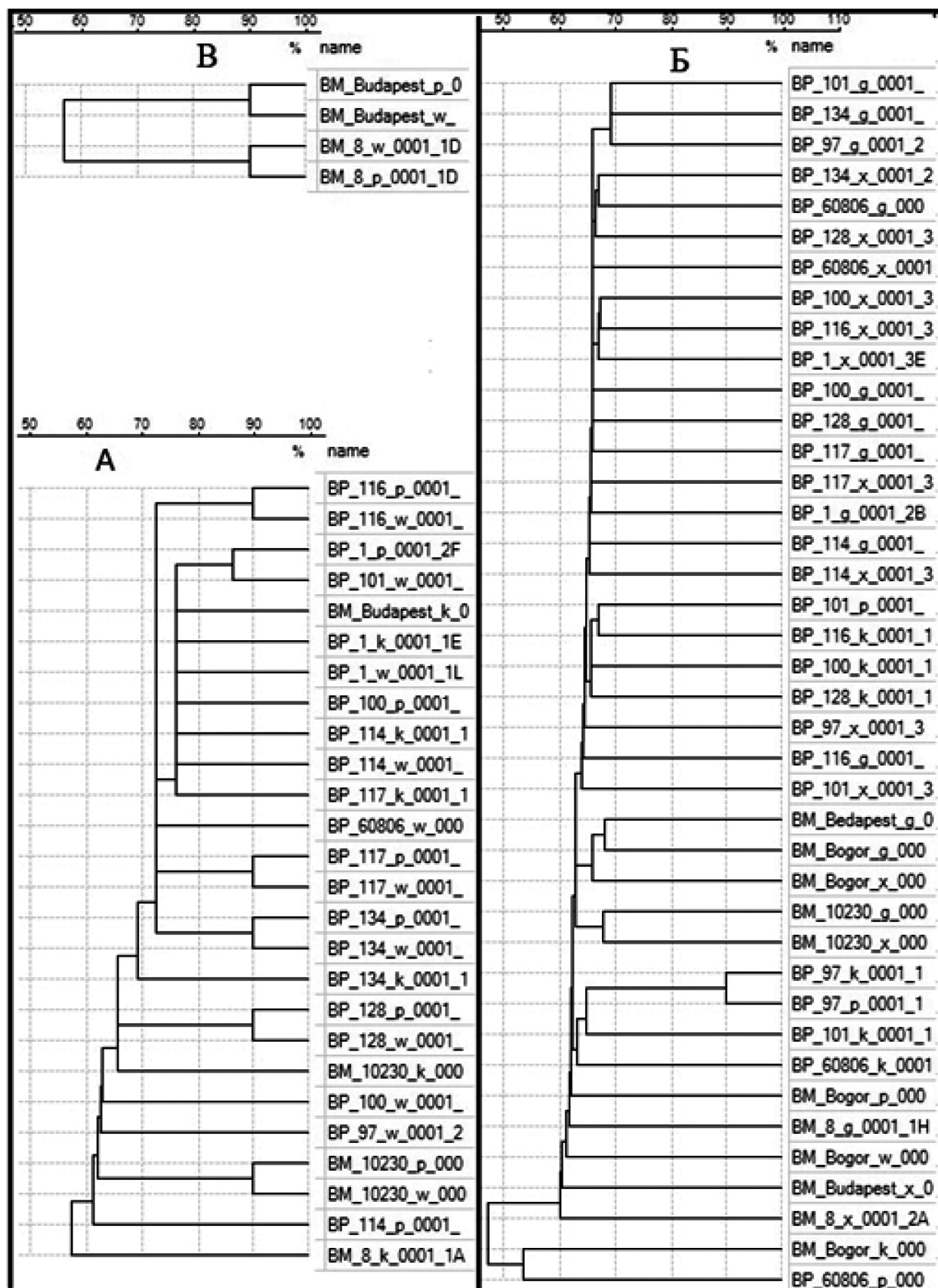


Рис. 2. Кластеры на дендрограмме сходства исследованных штаммов. А — первый кластер, Б — второй кластер, В — третий кластер. Буквами «р», «х», «к», «г», а также «w» после названия обозначена принадлежность штамма к группе резистентности к пероксиду водорода, хлорамину, катамину, глутаральдегиду, а также группе исходных штаммов, соответственно

SARAMIS все исходные штаммы идентифицировались как *B. pseudomallei* и *B. mallei* соответственно с достоверностью 90 % и выше. Однако только 40 % штаммов из групп, обладающие резистентностью к дезинфектантам были успешно идентифицированы до уровня рода *Burkholderia* spp. Для оставшихся 60 % штаммов процентный показатель принадлежности к *B. pseudomallei* или *B. mallei* либо составлял менее 75 (недостоверная идентификация), либо имела место ошибочная идентификация как представителей семейства *Burkholderiaceae*: *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* и т.п.

Обсуждение

В целом какой-либо отчётливой взаимосвязи между устойчивостью к дезинфектанту и масс-спектрометрическим профилем не наблюдается. Однако, исходя из характера распределения штаммов по кластерам, можно сделать предположение, что при формировании у возбудителей сапа и мелиоидоза резистентности к пероксиду водорода, а также катамину, в общем составе внутриклеточных белков происходят большие изменения, по сравнению с исходными штаммами, а также резистентными к хлорамину и глутаральдегиду. Интересно, что третий кластер включал в себя только штаммы возбудителя сапа, при этом показатель сходства внутри него значительно превышал аналогичные показатели среди других кластеров. Это может свидетельствовать о меньшей вариабельности в составе общеклеточных белков при формировании резистентности у конкретных штаммов (8 и «Будапешт»). Что касается средне- и высокоинтенсивных пиков, они также встречаются на масс-спектрах *B. thailandensis* и *B. cepacia* [6] и по всей видимости соответствуют рибосомальным белкам, наиболее широко представленным в клетке количественно. Каждый из них по отдельности не является специфичным, к примеру, массовый пик 9600 присутствует на масс-спектрах некоторых видов *Bacillus*, а пики 4800 и 6212 — на масс-спектрах *E. coli*. Однако наличие нескольких из них на спектрограмме может послужить признаком того, что исследуемый микроорганизм принадлежит к роду *Burkholderia*. Это может быть полезным, поскольку позволит даже визуально оценить экспериментальный масс-спектр, без сравнения с базой данных или использования специализированного программного обеспечения. Сравнительный анализ также позволил выделить несколько десятков пиков с низким показателем сигнал/шум, присутствовавших только на масс-спектрах *B. pseudomallei* или *B. mallei*, однако их количество, m/z , а также интенсивность варьируются у различных штаммов, поэтому маловероятно, что их можно считать специфичными для вида масс-спектрометрическими маркерами. Такая картина вполне логична поскольку специфичные для вида белки содержатся в клетке в небольшом количестве и выделить их на масс-спектрах всего пула клеточных белков без

предварительного выделения и очистки крайне затруднительно. Это является проблемой при скрининге чистых культур патогенных буркхолдерий, поскольку даже наличие значительного количества штаммов, чья таксономическая принадлежность к роду *Burkholderia*, не является гарантией того, что удастся создать подходящий и универсальный референтный масс-спектр для их точной идентификации [7]. Наиболее рациональным в таком случае представляется дополнение имеющейся базы данных как можно большим количеством масс-спектров отдельных штаммов. Однако следует учитывать, что отличительный признак при этом должен быть закреплён в генотипе, и носить постоянный характер. В базе данных SARAMIS достаточно много референтных масс-спектров рода *Burkholderia* spp. и идентификация чистых культур в большинстве случаев проходит успешно, особенно при наличии этапа предварительной пробоподготовки с использованием муравьиной кислоты и ацетонитрила [8]. Однако в данном случае идентификация до уровня вида полностью проходила только для группы исходных штаммов, и лишь частично для представителей остальных групп. Можно сделать вывод о достаточно значимых отличиях в масс-спектрах среди видов штаммов рода *Burkholderia*. Масс-спектрометрический профиль клеточной культуры в данном случае может значительно варьироваться в зависимости не только от условий роста и пробоподготовки, но и от такого свойства микроорганизма как устойчивость к дезинфицирующим средствам [9, 10].

Заключение

Как видно из результатов исследования, при формировании устойчивости к дезинфицирующим средствам у возбудителей сапа и мелиоидоза произошли значительные изменения в белковом составе клеток, что обусловило снижение точности видовой идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Предположительно, данные вариации имеют как общую тенденцию вариативности белков для всех штаммов, пассированных на среде с дезинфектантами, так и индивидуальную, характерную для отдельной группы. В связи с этим чёткой кластеризации исследуемых исходных и мутантных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* согласно группам резистентности на дендрограмме сходства/различия не удалось обнаружить. С учётом общей визуальной схожести большинства масс-спектров во всех группах резистентности, эти изменения вероятнее всего выражаются в разнице показателя интенсивности у крупных и средних массовых пиках, а также изменении количества или сдвиге массовых пиков с низкой интенсивностью. В целом показана принципиальная пригодность масс-спектров резистентных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза с различной чувствительностью к дезинфицирующим средствам для дополнения базы данных. Выявлено, что часть массовых пиков постоянно присут-

ствуется на всех исследованных штаммах *B. pseudomallei* и *B. mallei*, и может быть использована как для визуальной, так и программной оценке принадлежности бактериальной культуры к роду *Burkholderia*. Вместе с тем, провести внутривидовую группировку резистентных штаммов патогенных буркхолдерий методом MALDI-TOF масс-спектрометрии не представляется возможным из-за слишком малых отличий между масс-спектрами штаммов. Кроме того, неясно из-за чего взаимные отличия в штаммах *B. mallei* и *B. pseudomallei* носят различный характер. Показано также, что как временная, так и постоянная устойчивость к дезинфектантам, оказывает

существенное влияние на пул клеточных белков и возможность корректной идентификации штамма методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Однако расширять базы данных масс-спектров за счёт таких штаммов представляется целесообразным только при закреплении признака. Также актуальным представляется проведение аналогичных исследований на большем количестве коллекционных и природных штаммов, в особенности возбудителей сапа. Возможно, при большей выборке штаммов отслеживаемые изменения будут носить более системный характер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захарова И.Б. Современное состояние и перспективы развития лабораторной диагностики мелиоидоза. Бактериология. 2022. Т. 7. № 3. С. 32–33
2. Vrioni G., Tsiamis C., Oikonomidis G., Theodoridou K., Kapsimali V., Tsakris A. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. Review Article on Biomarkers/Molecular Diagnostic Tools. — June 30. — 2018. — Vol 6, No 12
3. Tong C., Hu H., Chen G., Li Z., Li A., Zhang J. Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. Environmental Research. Volume 195, April 2021, 110897
4. Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В., Захарова И.Б., Викторов Д.В. Анализ резистентности у *Burkholderia pseudomallei* к бензалкония хлориду и антибиотикам. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 3. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-115-119
5. Chen X., Hou X., Xiao M., Zhang L., Cheng J. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Analysis for the Identification of Pathogenic Microorganisms: A Review. Microorganisms 2021, 9(7), 1536; <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071536>
6. Лопастейская Я.А., Молчанова Е.В., Шаров Т.Н., Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Викторов Д.В., Топорков А.В. Применение времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF) для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61(8): 502–507. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-502-507
7. Vianna E.F., Pentagna L.S., Menezes N.I., Freitas F.A., Leite C.F. et al. Decreasing the Cut-off Score Value of MALDI-ToF MS Increase the Identities of *Burkholderia cepacia* Complex Species. Curr Microbiol. 2021 Jun;78(6):2259–2263. doi: 10.1007/s00284-021-02493-x. Epub 2021 May 4.
8. Plongla R., Panagea T., Pincus D., Jones M., Gilliga P. Identification of *Burkholderia* and Uncommon Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Patients with Cystic Fibrosis by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). J Clin Microbiol. 2016 Nov 23; 54(12):3071–3072. doi: 10.1128/JCM.01623-16.
9. Rychert J.C. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. J Infectiology. 2019; 2(4): 1–5. doi.org/10.29245/2689-9981/2019/4.1142.
10. Hou T., Chiang C., Teng S. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. J. of Food and Drug Analysis. Volume 27, Issue 2, April 2019, Pages 404–414.

© Шаров Тимур Николаевич (timursharov@gmail.com); Лучинин Дмитрий Николаевич (luchinin.dmitrii@yandex.ru); Молчанова Елена Владимировна (unicorn54@mail.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»