

УДК 57.088.5:543.51
©Коллектив авторов

ШТАММОВАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ПОСРЕДСТВОМ ПРЯМОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ

М.А. Корниенко^{1}, Е.Н. Ильина¹, А.Д. Боровская¹, М.В. Эдельштейн²,
М.В. Сухорукова², М. Кострцева³, В.М. Говорун¹*

¹ФГУ НИИ Физико-химической медицины ФМБА, России, Москва, 119435,
Малая Пироговская, 1а; тел.: +74992464570; эл. почта: kornienkomariya@gmail.com

²НИИ Антимикробной химиотерапии СГМА, России, Москва

³Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия

Staphylococcus aureus - один из наиболее интересных для клинических исследований видов микроорганизмов, обладающий большим штаммовым разнообразием, в первую очередь за счёт вариативности факторов вирулентности и патогенности. Целью настоящего исследования явилась апробация метода быстрой штаммовой дифференциации стафилококков по определённому признаку на основании регистрации отличительных особенностей MALDI масс-спектров, накапливаемых в ходе прямого белкового профилирования бактериальной клетки. В качестве модельных признаков, регистрируемых как штаммовые отличия, были выбраны продукция β -лактамазы и α -гемолизина, обусловленные наличием генов *blaZ* и *hla* соответственно.

Математический анализ совокупности MALDI масс-спектров, накопленных для 53 изолятов *S. aureus* с применением генетического алгоритма кластеризации, позволил построить две независимые классификационные модели, способные дифференцировать штаммы по рассматриваемым признакам. По статистическому вкладу в модель каждого масс-пика были выявлены наиболее значимые пики (массы), которые можно рассматривать как маркеры штаммовых различий стафилококков. Построенные диагностические модели отличались коэффициентами чувствительности и специфичности, которые составили 97,5% и 82,5% для разделения штаммов по признаку продукции β -лактамазы и 90,0% и 88,7% по наличию α -гемолизина.

Ключевые слова: *Staphylococcus*, штаммовая дифференциация, MALDI-MS.

ВВЕДЕНИЕ. *Staphylococcus aureus* традиционно вызывает повышенный интерес у исследователей, работающих в области клинической микробиологии. Это связано, во-первых, с широким спектром воспалительных реакций, причиной которых является данный микроорганизм, а, во-вторых - с возникновением и распространением лекарственно-устойчивых форм стафилококков, часто выступающих в роли этиотропного агента при формировании госпитальных инфекций.

* - адресат для переписки

Патогенность штаммов стафилококков во многом обусловлена наличием широкого спектра различных факторов вирулентности [1]. Традиционно в качестве факторов вирулентности и патогенности любого бактериального возбудителя принято рассматривать свойства, благоприятствующие его распространению в природной популяции. Для стафилококка к таким факторам относятся формирование устойчивости к антибактериальным препаратам, продукция многочисленных экзотоксинов, высокая адгезивность в отношении эукариотических клеток человека, способность к колонизации эпителия. Основными токсинами стафилококков являются различные гемолизины, лейкоцидин Пантона-Валентайна, большой спектр энтеротоксинов, относящихся к нескольким серологическим типам А-Е, G, H, I, J, K-R, токсин синдрома токсического шока, эксфолиативные токсины А и В и т.д. В основном стафилококковые токсины - это белки молекулярной массой от 22 до 34 кДа [2]. Белковое происхождение также могут иметь и некоторые факторы адгезии и колонизации, например α -гемолизин, кодируемый геном *hla* и имеющий молекулярную массу 33 кДа [1]. α -Гемолизин обладает не только цитолитическими свойствами в отношении моноцитов, лимфоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, но и необходим для образования биоплёнок, а так же адгезии бактериальных клеток на поверхности клеток хозяина [1, 3].

Поскольку наибольшим уровнем активности в отношении *S. aureus* обладают β -лактамы антибиотики [4], формирование устойчивости к этой группе антибактериальных препаратов рассматривают сейчас как один из основных факторов патогенности. Устойчивость к пенициллину связана с продукцией штаммами *S. aureus* β -лактамаз, кодируемых геном *blaZ*. β -Лактамазы гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины за исключением метициллина и изоксазолилпенициллинов [4]. Устойчивость к метициллину связана с обнаружением у штаммов стафилококков дополнительного пенициллинсвязывающего белка, обладающего пониженной афинностью к β -лактамам антибиотикам [5]. Этот белок кодируется геном *mecA* и его присутствие в геноме стафилококка обеспечивает фенотипическую устойчивость ко всем β -лактамам антибиотикам [4]. Часто в состав *mec* кассеты могут входить гены, ответственные за устойчивость к другим классам антибиотиков, таким как аминогликозиды, макролиды, линкозамиды, тетрациклины [4, 6]. До недавнего времени такие штаммы, получившие название MRSA (метициллин устойчивые *S. aureus*), сохраняли чувствительность к гликопептидному антибиотику ванкомицину. Однако, начиная с 1997 года, появились сообщения об обнаружении устойчивых к ванкомицину стафилококков. Механизм устойчивости штаммов *S. aureus* к ванкомицину не однозначен и может быть связан как с усилением синтеза пептидогликана и уменьшением образования поперечных сшивок, т.е. за счёт утолщения клеточной стенки, так и с передачей стафилококкам плазмиды энтерококков, несущей ген *vanA*, ответственный за устойчивость энтерококков к ванкомицину [4, 7, 8].

Сегодня одним из быстро развивающихся направлений видовой идентификации микроорганизмов является прямое MALDI – масс-спектрометрическое профилирование бактериальных белков и пептидов. Впервые использование масс-спектрометрии для идентификации бактерий было предложено в 1975 году [9], сейчас метод прямого MALDI – масс-спектрометрического профилирования используется многими клиническими и научными лабораториями мира для решения задач по исследованию клеточных микроорганизмов [10-16]. Данный подход основан на накоплении MALDI масс-спектров грубого лизата клеток исследуемого микроорганизма и последующим сопоставлением их с аналогичными масс-спектрами, хранящимися в базах данных или между собой.

Видовая идентификация с помощью прямого MALDI – масс-спектрометрического профилирования занимает порядка нескольких минут для единичного образца

и 1,5 ч для 96 образцов, что делает его одним из наиболее быстрых методов идентификации микроорганизмов.

Поскольку многие факторы вирулентности и патогенности стафилококков имеют белковую природу и потенциально их присутствие может отражаться на регистрируемых масс-спектрах клеточного лизата, в настоящем исследовании была поставлена задача оценить возможности и ограничения прямого масс-спектрометрического профилирования для штаммового типирования *S. aureus*.

МЕТОДИКА.

Бактериальные штаммы. В исследование включены 53 штамма *S. aureus*, выделенные в период 2005-2010 в стационарах России. Первичная видовая идентификация проводилась на основании классических бактериологических тестов - окраска по Граму, тесты на каталазную и коагулазную активность, ферментация маннитола.

Масс-спектрометрическое тестирование.

Прямое масс-спектрометрическое профилирование бактериального лизата. Свежие бактериальные клетки (1–2 колонии) переносили в 300 мкл деионизированной воды, перемешивали и добавляли 900 мкл этанола. Осадок после центрифугирования (16,1 g × 15 мин) растворяли в 20 мкл смеси 50% ацетонитрила и 35% муравьиной кислоты. Полученный в результате последующего центрифугирования супернатант анализировали времяпролетной MALDI масс-спектрометрией. Все использованные реактивы, включая воду, были аналитической чистоты или специальные для масс-спектрометрии. В качестве матрицы использовали насыщенный раствор альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, α -CHCA, “Bruker Daltonics”, Германия) в 50% ацетонитриле и 2,5% трифторуксусной кислоте.

Для сокристаллизации матрицы и образца 1 мкл аналита наносили на ячейку стальной мишени для масс-спектрометрии (MSP 96 target ground steel, “Bruker Daltonics”), давали подсохнуть 1-2 мин и сверху наслаивали 2 мкл насыщенного раствора матрицы. Кристаллы оставляли на воздухе в течение 5-10 мин до полного высыхания.

Масс-спектры получали с использованием времяпролетного масс-спектрометра Microflex (“Bruker Daltonics”), оснащенного азотным лазером 337 нм. Спектры регистрировали в линейном режиме положительно заряженных ионов (20 kV) в диапазоне масс 2000–20000 Да. Для калибровки использовали бактериальный тест стандарт (“Bruker Daltonics”). Для увеличения чувствительности детекции избыток матрицы удаляли 6 импульсами лазера при мощности 40% с последующей аккумуляцией данных при мощности лазера от 30% до 40%. Для каждого спектра суммировали результаты 240 лазерных импульсов (по 40 импульсов с различных точек пятна). Суммировали спектры с разрешением более 400.

Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение компании “Bruker Daltonics”: flexControl 2.4 и flexAnalysis 2.4.

Идентификация проводилась с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 2.0 (“Bruker Daltonics”), путём сопоставления полученных спектров со спектрами библиотеки MALDI Biotyper 2.0 (“Bruker Daltonics”) (3746 спектров различных микроорганизмов). Видовая идентификация считалась достоверной, если значение численной оценки наилучшего совпадения, рассчитываемое программным обеспечением, выше 2,000. Если это значение попадает в интервал от 1,700 до 1,999, то достоверна идентификация до рода.

Анализ масс-спектрометрических данных. Построение дендрограмм проводилось с помощью программы MALDI Biotyper 2.0 (“Bruker Daltonics”).

Сравнительную кластеризацию масс-спектров осуществляли с использованием программного обеспечения ClinProTools 2.1 (“Bruker Daltonics”). Математические модели для классификации масс-спектров пептидов и белков, полученных в ходе прямого масс-спектрометрического профилирования клеточных лизатов (по 8 масс-спектров для каждого штамма) строили на основе генетического

КЛАССИФИКАЦИЯ *S. AUREUS* МС ПРОФИЛИРОВАНИЕМ

алгоритма. При построении классификационных моделей использовали следующие параметры: количество пиков, входящих в создаваемую модель классификации - не более 20, число поколений - не более 200, количество соседей варьировалось (1, 3, 5, или 7), коэффициент мутаций: 0,2, коэффициент кроссинговера: 0,5. Для построения классификационных моделей масс-спектры каждой из групп (не обладающие и обладающие изучаемым признаком) разделяли на две подгруппы, одну пару использовали для построения классификационной модели (обучающие подгруппы), а вторую - для проверки её достоверности (валидационные подгруппы). Основными значениями, позволяющими оценить качество классификационной математической модели, являются коэффициент распознавания (recognition capability), специфичность и чувствительность. Коэффициент распознавания характеризует способность модели относить масс-спектры, по которым она построена, в правильную группу. Специфичность и чувствительность в данном случае являются коэффициентами внешней валидации, т.е. это процент правильно отнесенных масс-спектров в одну из двух групп.

Генетическое тестирование.

Выделение ДНК. Для выделения геномной ДНК стафилококков использовался набор “ДНК-экспресс” (ТУ–9398-450-17253567-03) производства ООО НПФ Литех, Россия, в соответствии с прилагаемыми инструкциями). Пробы ДНК хранили при -20°C.

Амплификация генов *16S pPHK*, *blaZ*, *hla* *S. aureus*. Для амплификации генов *16S pPHK*, *blaZ*, *hla* использовали олигонуклеотидные праймеры 16Sup, 16Slow [17], blaZ-F, blaZ-R, hla1, hla2 соответственно, последовательность праймеров представлена в таблице 1. Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 66 мМ Tris-HCl (pH 9,0), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 250 мкМ каждого dNTP, 1ед. Taq ДНК полимеразы (ООО НПФ Литех, Россия), по 5 пмоль праймеров для амплификации фрагмента гена *16S pPHK*; по 10 пмоль праймеров для амплификации фрагментов генов *blaZ* или *hla*. Реакцию ставили на TETRAD DNA ENGINE (“MJ Research, Inc.”) при 94°C 2 мин, далее 35 циклов: 94°C 30 сек, 58°C 30 сек, 72°C 30 сек. Продукты амплификации анализировали в 2% агарозном геле с визуализацией бромистым этидием.

Таблица 1. ПЦР праймеры для амплификации участка генов *16S pPHK*, *blaZ*, *hla*.

Ген	Название	5'-3' последовательность	Температура реакции, °C	Размер ампликона, бп
<i>16S pPHK</i>	16Sup	agacictctacgggaggcagcag	59	756
	16Slow	tctcacgacacgagctgacgac	59	
<i>blaZ</i>	blaZ-F	aagagatttgctatgcttc	58	518
	blaZ-R	gcttgaccacttttatcagc	58	
<i>hla</i>	hla1	atagagatacttgggaacccg	58	294
	hla2	tactgaagacgactgtgttc	58	

Определение нуклеотидной последовательности генов *16S pPHK*. Перед постановкой реакции секвенирования ампликоны, полученные в ходе амплификации гена *16S pPHK*, обрабатывали щелочной фосфатазой арктических

креветок и экзонуклеазой I *E. coli* (ExoI) для инактивации неизрасходованных нуклеотидов и деградации олигонуклеотидных праймеров. Для этого к полученным ампликонам добавляли по 5 мкл смеси, содержащей 66 mM Tris-HCl pH 9,0; 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,5 mM MgCl_2 , 5 ед. ExoI (“Fermentas”, Литва), и 0,5 ед. щелочной фосфатазы арктических креветок (“Fermentas”). Инкубировали в течение 20 минут при 37°C с последующей инактивацией ферментов прогреванием в течение 10 мин при 85°C.

Определение нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов ДНК проводили модифицированным методом Сенгера с использованием ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit и прибора ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США) в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Поиск гомологичных *16S pPHK* последовательностей проводили в GenBank, используя алгоритм BLAST.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Первичная бактериологическая видовая идентификация всех отобранных штаммов *S. aureus* (n=53) была подтверждена двумя молекулярными методами: прямым MALDI масс-спектрометрическим профилированием и секвенированием генов *16S pPHK*. На основании сопоставления масс-спектров, снятых для изучаемых штаммов *S. aureus*, со спектрами, имеющимися в базе данных MALDI Biotyper, все бактериальные культуры были однозначно идентифицированы как вид *S. aureus* с численной оценкой совпадения от 2,105 до 2,616. Характерный для штаммов *S. aureus* спектр представлен на рисунке 1. Секвенирование генов *16S pPHK* так же подтвердило, что все штаммы относятся к виду *S. aureus*.

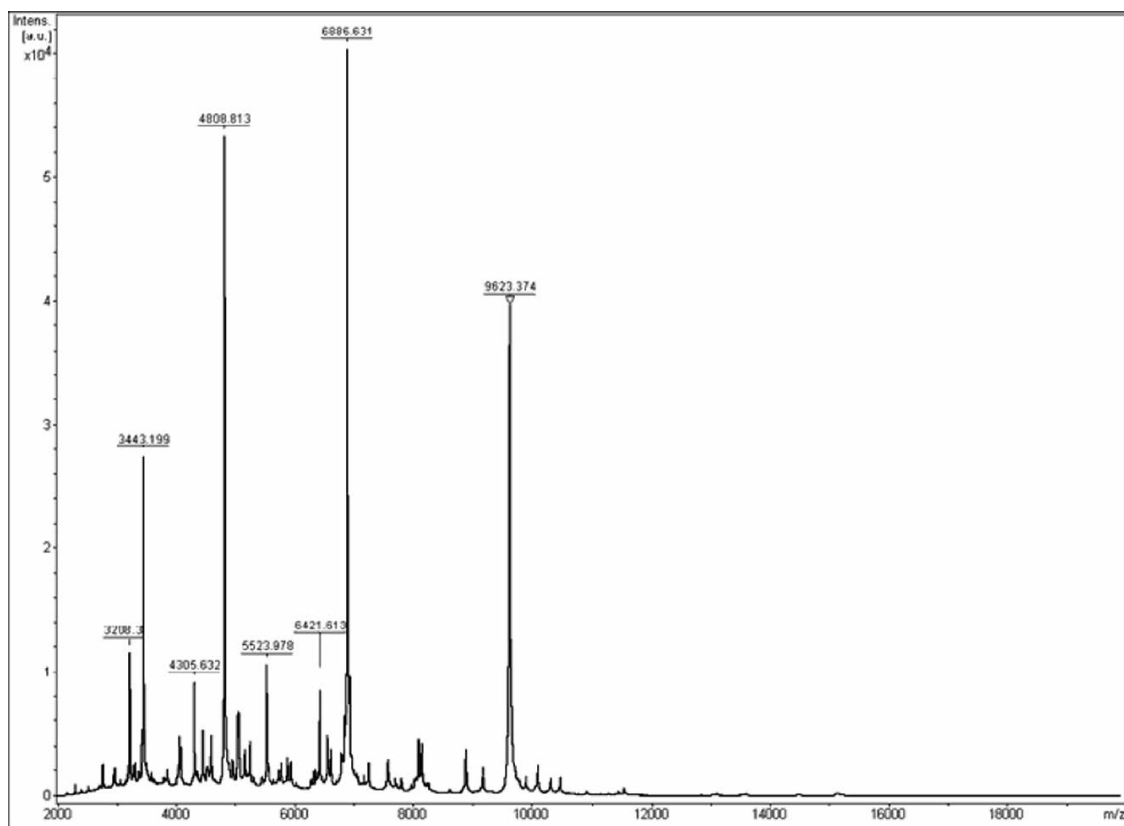


Рисунок 1.
Характерный MALDI масс-спектр для штаммов *S. aureus*.

КЛАССИФИКАЦИЯ *S. AUREUS* МС ПРОФИЛИРОВАНИЕМ

Включённые в исследование штаммы *S. aureus* были протестированы на наличие генов *hla* и *blaZ*, кодирующих α -гемолизин и β -лактамазу соответственно. Наличие или отсутствие генов *hla* и *blaZ* было установлено по результатам амплификации со специфическими праймерами. Для исключения ложноотрицательных результатов одновременно с целевым геном (*hla* и *blaZ*) проводилась амплификация фрагментов гена *16S pPHK* в формате мультиплексной реакции (рис. 2). Согласно результатам амплификации, в проанализированной выборке 4 штамма не обладали искомыми факторами вирулентности/патогенности, у 9 штаммов обнаружен ген *blaZ* при отсутствии гена *hla*, у 7 штаммов выявлен ген *hla* при отсутствии *blaZ*, и 33 штаммов содержали оба гена вирулентности/патогенности.

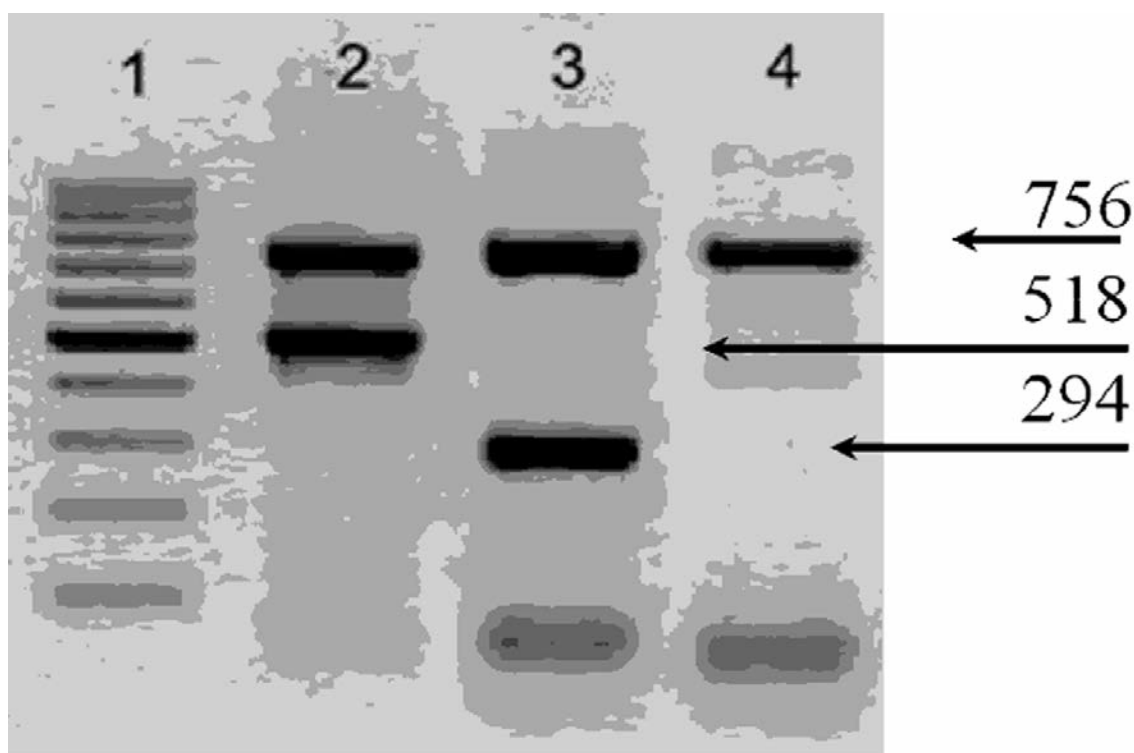


Рисунок 2.

Электрофореграмма продуктов амплификации генов *hla* и *blaZ*: 1 - GeneRuler TM 100bp Plus DNA Ladder ("Fermentas"); 2 - изолят, имеющий ген *blaZ*; 3 - изолят, имеющий ген *hla*, 4 - изолят, не имеющий генов *blaZ* и *hla*.

Анализ масс-спектров, полученных в ходе идентификации методом прямого масс-спектрометрического профилирования (восемь суммарных спектров для каждого образца), был проведён с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 2.0 и ClinProTools 2.0.

Дендрограммы, построенные на основании кластеризации масс-спектров по алгоритму "correlation" в программе MALDI Biotyper 2.0, позволили зарегистрировать отличия в масс-спектрах проанализированных изолятов (рис. 3, 4), однако полученное распределение штаммов не удалось связать с рассматриваемыми фенотипическими признаками.

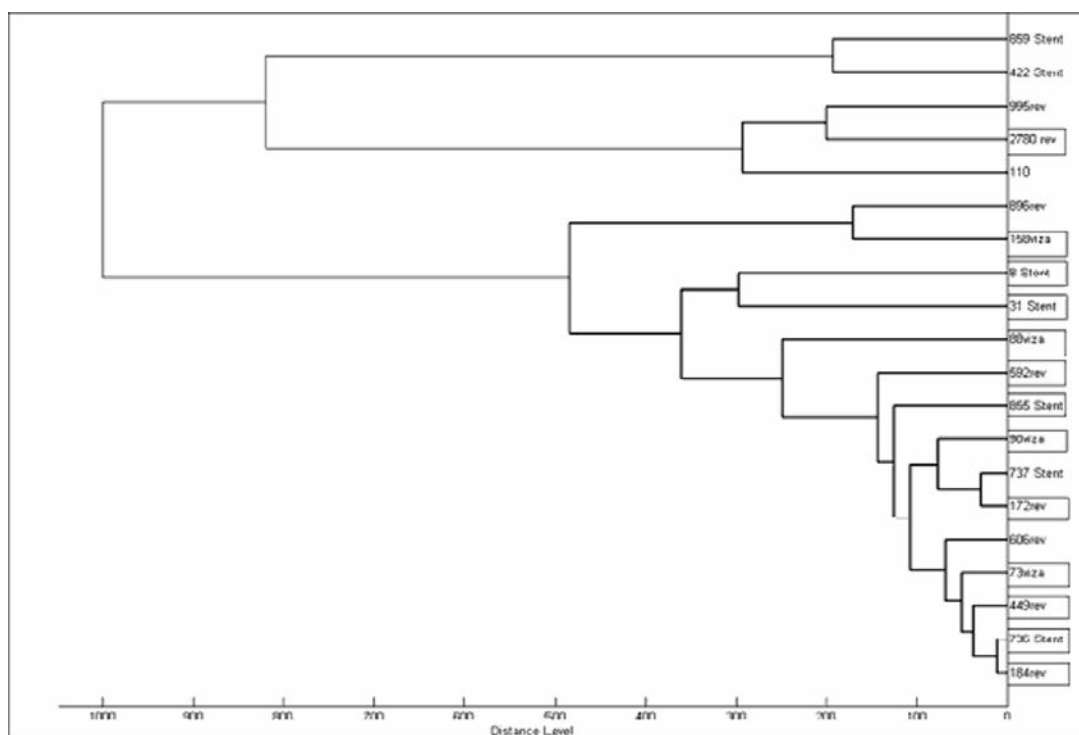


Рисунок 3.

Сравнительный анализ масс-спектров штаммов стафилококков, исследованных на наличие/отсутствие гена *blaZ*, выполненный с использованием программы MALDI Biotyper 2.0. Изоляты, несущие ген *blaZ* выделены прямоугольниками.

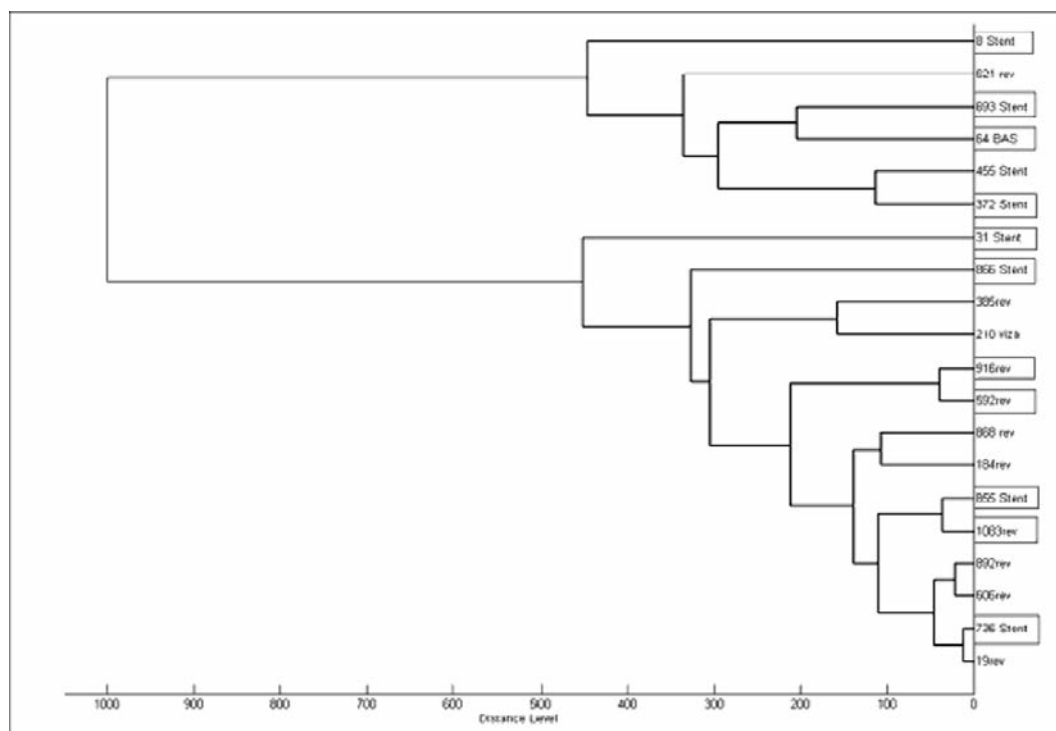


Рисунок 4.

Сравнительный анализ масс-спектров штаммов стафилококков, исследованных на наличие/отсутствие гена *hla*, выполненный с использованием программы MALDI Biotyper 2.0. Изоляты, несущие ген *hla* выделены прямоугольниками.

КЛАССИФИКАЦИЯ *S. AUREUS* МС ПРОФИЛИРОВАНИЕМ

С привлечением программного пакета ClinProTools 2.0, предназначенного для углубленного анализа масс-спектров, были построены независимые классификационные математические модели, позволившие классифицировать штаммы *S. aureus* по наличию или отсутствию генов *hla* и *blaZ* в геноме. Состав обучающих и валидационных групп, использованных при построении моделей, представлен в таблице 2.

Таблица 2. Состав обучающих и валидационных групп для математических моделей, позволяющих классифицировать штаммы по признаку наличия или отсутствия в геноме гена α -гемолизина или β -лактамазы.

Классификационная модель	Обучающие группы		Валидационные группы	
По наличию/отсутствию гена <i>blaZ</i>	Изоляты, не несущие ген <i>blaZ</i> (6 изолятов, общее количество масс-спектров 40)	Изоляты, несущие ген <i>blaZ</i> (7 изолятов, общее количество масс-спектров 55)	Изоляты, не несущие генов <i>blaZ</i> (5 изолятов, общее количество масс-спектров 40)	Изоляты, несущие ген <i>blaZ</i> (8 изолятов, общее количество масс-спектров 64)
По наличию/отсутствию гена <i>hla</i>	Изоляты, не несущие ген <i>hla</i> (6 изолятов, общее количество масс-спектров 44)	Изоляты, несущие ген <i>hla</i> (11 изолятов, общее количество масс-спектров 88)	Изоляты, не несущие ген <i>hla</i> (4 изолята, общее количество масс-спектров 32)	Изоляты, несущие ген <i>hla</i> (13 изолятов, общее количество масс-спектров 104)

Модель, наиболее хорошо классифицирующая штаммы по признаку наличия гена β -лактамазы, была построена с использованием генетического алгоритма с тремя соседями. Коэффициент распознавания для этой модели составил 100%. Коэффициенты внешней валидации составили 97,5% и 82,5% для группы штаммов, не несущих ген *blaZ*, и группы штаммов, несущих ген *blaZ*, соответственно. Масс-спектрометрические пики, вошедшие в модель, и их статистический вес в этой модели представлены в таблице 3. Наибольший вес в построение модели и, следовательно, наибольший вклад в дифференциацию штаммов по наличию гена *blaZ*, внесли пики, соответствующие массам: 3583,07, 4444,93, 5436,59 и 6421,59 Да. По двум наиболее значимым (3583,07 Да и 5436,51 Да) было построено статистическое распределение масс-спектров штаммов *S. aureus*, представленное на рисунке 5.

Для классификации штаммов по наличию или отсутствию в геноме гена α -гемолизина была построена модель с использованием генетического алгоритма с пятью соседями. Коэффициент распознавания для этой модели составил 100%. Коэффициенты внешней валидации составили 90,0% и 88,7% соответственно для группы изолятов, не несущих ген *hla*, и группы изолятов, несущих ген *hla*. Масс-спектрометрические пики, вошедшие в модель, и их статистический вес в этой модели представлены в таблице 4. Наибольший вес в построение модели по наличию гена *hla* внесли пики массой 3275,42, 6550,57 и 6589,81 Да. Статистическое распределение масс-спектров штаммов *S. aureus* по двум наиболее значимым массам (6550,57 Да и 6589,81 Да) представлено на рисунке 6.

Таблица 3. Пики, входящие в математическую модель, позволяющую классифицировать штаммы по признаку наличия или отсутствия в геноме гена β -лактамазы

Порядковый номер пика	Масса (Да), соответствующая середине пика	Масса (Да), соответствующая началу пика	Масса (Да), соответствующая концу пика	Статистический вес пика
6	2822,14	2812,65	2840,12	0,3688
10	3175,42	3160,5	3184,68	0,4179
12	3275,56	3254,88	3281,09	0,0368
17	3442,92	3427,76	3458,51	0,4198
20	3529,03	3524,3	3537,27	0,4621
22	3583,07	3571,11	3597,69	1,0169
29	4444,93	4427,29	4472,44	0,8403
30	4481,75	4475,36	4501,2	0,1730
35	4936,78	4922,23	4961,11	0,5340
37	5050,48	5043,47	5064,16	0,6646
39	5159,97	5133,8	5183,98	0,4486
40	5199,13	5183,98	5212,84	0,1499
42	5436,59	5417,64	5445,53	1,3546
53	6421,59	6395,07	6444,05	0,8670
58	6589,67	6582,08	6601,58	0,1944
70	7123,83	7107,65	7128,53	0,7668
79	7731,85	7715,94	7752,42	0,4110
80	7798,79	7752,42	7863,04	0,1301
94	9317,27	9296,4	9372,34	0,5804
95	9624,14	9588,49	9657,03	0,4677

Таблица 4. Пики, входящие в математическую модель, позволяющую классифицировать штаммы по признаку наличия или отсутствия в геноме гена α -гемолизина.

Порядковый номер пика	Масса (Да), соответствующая середине пика	Масса (Да), соответствующая началу пика	Масса (Да), соответствующая концу пика	Статистический вес пика
9	3275,42	3255,5	3283,81	1,1504
13	3423,49	3397,0	3426,77	0,6900
22	4073,48	4064,27	4099,16	0,3931
41	5585,75	5579,8	5614,66	0,7046
48	6304,94	6291,27	6327,12	0,7108
54	6550,57	6526,73	6563,25	1,4073
56	6589,81	6582,72	6601,64	1,5417
75	7693,9	7683,15	7720,84	0,8128
90	9070,54	9049,1	9090,7	0,1318
110	13093,15	13032,59	13170,08	0,2410

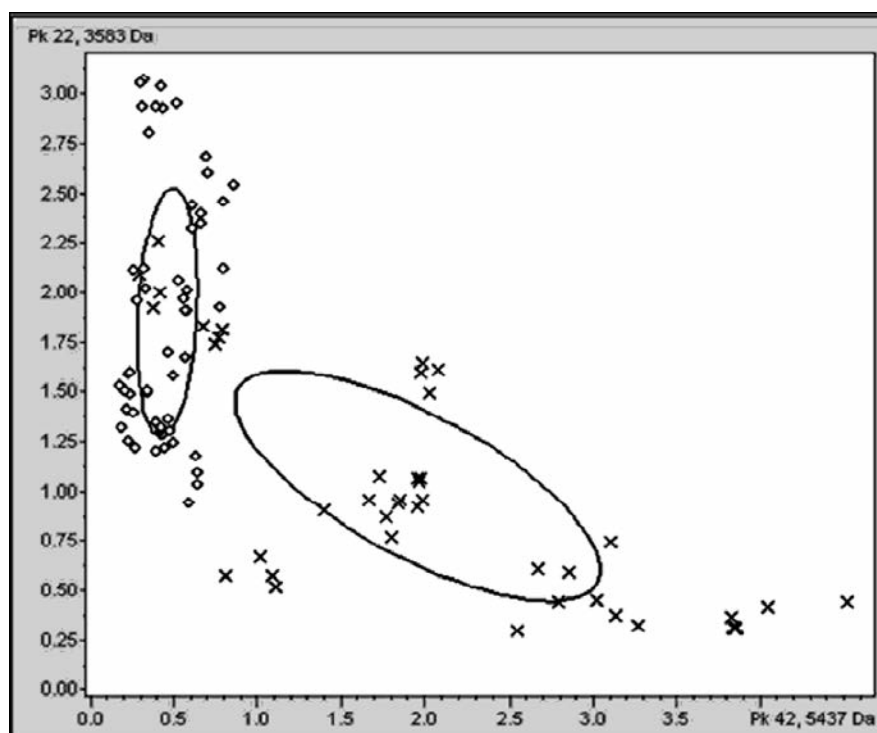


Рисунок 5.

Статистическое распределение изолятов по пикам № 22 и № 42 (выделены серым в таблице 3):
 (x) - распределение площадей пиков, принадлежащих изолятам, не несущим гена β -лактамазы;
 (o) - распределение площадей пиков, принадлежащих изолятам, имеющим ген β -лактамазы.

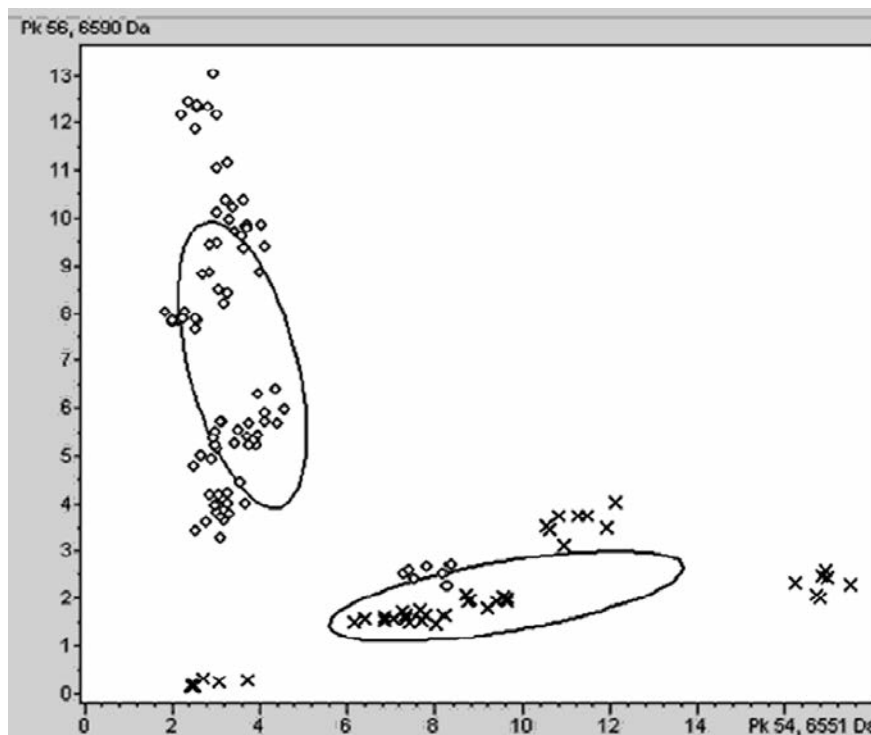


Рисунок 6.

Статистическое распределение изолятов по пикам № 54 и № 56 (выделены серым в таблице 4):
 (x) - распределение площадей пиков, принадлежащих изолятам, не несущим гена α -гемолизина;
 (o) - распределение площадей пиков, принадлежащих изолятам, имеющим ген α -гемолизина.

ОБСУЖДЕНИЕ. В настоящем исследовании для верификации данных бактериологической идентификации штаммов *S. aureus* использован новый молекулярный подход, получивший название прямого масс-спектрометрического профилирования. Метод прямого масс-спектрометрического профилирования зарекомендовал себя, как надежный и воспроизводимый метод, используемый для быстрой идентификации клинических изолятов бактерий и грибов [15, 18].

Все штаммы собранной коллекции были идентифицированы как представители вида *S. aureus* по технологии MALDI Biotyper с численной оценкой выше 2,000, что говорит о хорошем качестве получаемых масс-спектров и свидетельствует о высокой достоверности полученных данных.

Для подтверждения идентификации методом прямого масс-спектрометрического профилирования, полученной с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper 2.0, было проведено секвенирование генов *16S rRNA* штаммов. Секвенирование гена *16S rRNA* является одним из наиболее достоверных методов идентификации микроорганизмов [19, 20]. Идентификация штаммов этим методом полностью подтвердила результаты, полученные методом прямого масс-спектрометрического профилирования. Необходимо отметить, что идентификация методом прямого масс-спектрометрического профилирования - более быстрый и менее трудоёмкий метод, чем секвенирование гена *16S rRNA*. На идентификацию методом прямого масс-спектрометрического профилирования одного образца требуется несколько минут, а на идентификацию мишени, включающей 96 образцов, потребуется всего полтора часа. При этом секвенирование генов *16S rRNA* для 96 образцов занимает около двух дней. Учитывая достоинства метода прямого масс-спектрометрического профилирования, можно считать его перспективным как для научных, так и для клинических лабораторий, исследующих различные штаммы *S. aureus*.

Для оценки границ применения метода прямого масс-спектрометрического профилирования совокупность всех накопленных масс-спектров проанализировали с привлечением различных алгоритмов кластерного анализа, реализуемых в программных продуктах MALDI Biotyper 2.0 и ClinProTools 2.0. Как известно, в масс-спектре, регистрируемом в диапазоне масс от 2 до 20 кДа, в основном находятся пики рибосомных белков микроорганизмов, которые являются крайне консервативными белками внутри одного вида. И при сопоставлении спектров в процессе идентификации, именно рибосомальные белки вносят основной вклад в определение вида [21]. Чтобы выяснить, отражают ли масс-спектры, полученные методом прямого масс-спектрометрического профилирования помимо видовой принадлежности изолятов их штаммовую специфичность, было решено проанализировать масс-спектры *S. aureus*, так как разные штаммы *S. aureus* несут различные факторы вирулентности и патогенности. Поскольку большинство факторов вирулентности и патогенности имеют массу большую, чем диапазон детекции пиков масс-спектра [1], при интерпретации спектров мы исходили из предположения, что в процессе пробоподготовки белки могут претерпевать некоторые изменения, например, частичную деградацию и фрагментацию.

Из всей совокупности факторов вирулентности и патогенности стафилококка были выбраны: α -гемолизин и β -лактамаза. α -гемолизин был рассмотрен как пример фактора вирулентности и патогенности, ответственного за инвазию и адгезию, а β -лактамаза - как пример фактора вирулентности и патогенности, отвечающего за устойчивость к антибиотикам.

В качестве первого этапа анализа была проведена оценка возможностей программного обеспечения MALDI Biotyper 2.0, используемого на стадии идентификации изолятов. Как видно из сопоставления дендрограмм (рис. 3, 4), построенных на основании алгоритмов кластеризации программного обеспечения MALDI Biotyper 2.0, и данных результатов генетического тестирования, не наблюдается четкого разделения масс-спектров, полученных в результате метода прямого бактериального профилирования, на кластеры,

КЛАССИФИКАЦИЯ *S. AUREUS* МС ПРОФИЛИРОВАНИЕМ

образуемые масс-спектрами штаммов, обладающих и не обладающих генами α -гемолизина и β -лактамазы. Это свидетельствует о неприменимости использования алгоритмов программы MALDI Biotyper 2.0 для дифференциации изолятов на штаммовом уровне.

Другим вариантом кластеризации масс-спектров является подход, основанный на использовании алгоритмов программного обеспечения ClinProTools 2.0. Программное обеспечение ClinProTools 2.0, как подход к групповой кластеризации масс-спектров, создавалось для поиска маркеров белковой природы к различным онкологическим заболеваниям [22-24].

Построенные с помощью программного обеспечения ClinProTools 2.0 модели классификации штаммов по наличию или отсутствию в геноме гена α -гемолизина и β -лактамазы имели высокие коэффициенты чувствительности и специфичности, значение которых показывает принципиальную возможность разделения изолятов *S. aureus* на штаммовом уровне по наличию генов β -лактамазы и α -гемолизина. Кроме того, классификационные математические модели позволили выявить пики (массы), наиболее ответственные за дифференциацию штаммов.

Сходный приём был использован при классификации штаммов *S. aureus*, несущих гены лейкоцидина Пантона-Валентайна [25], что подтверждает универсальность данного подхода для изучения различных факторов вирулентности и патогенности *S. aureus*.

Поскольку метод прямого бактериального профилирования хорошо зарекомендовал себя и используется многими клиническими и научными лабораториями, то использование классификационных моделей позволило бы значительно расширить диагностические возможности данных лабораторий, поскольку сама классификация по какому-либо признаку очень проста в исполнении и занимает несколько минут, при условии, что математическая модель по этому признаку уже существует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Plata K., Rosato A.E., Wegrzyn G. (2009) Acta Biochim. Pol., **56**(4), 597-612.
2. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. (2000) Clin. Microbiol. Rev., **13**(1), 16-34.
3. Caiazza N.C., O'Toole G.A. (2003) J. Bacteriol., **185**(10), 3214-3217.
4. Сидоренко С.В. (2003) Инфекции и антимикробная терапия, **5**(2), 48-55.
5. Hartman B.J., Tomasz A. (1984) J. Bacteriol., **158**(2), 513-516.
6. Turlej A., Hryniewicz W., Empel J. (2011) Pol. J. Microbiol., **60**(2), 95-103.
7. Cui L., Iwamoto A., Lian J.Q., Neoh H.M., Maruyama T., Horikawa Y., Hiramatsu K. (2006) Antimicrob. Agents Chemother., **50**(2), 428-438.
8. Rong S.L., Leonard S.N. (2010) Ann. Pharmacother., **44**(5), 844-850.
9. Anhalt J.P., Fenselau C. (1975) Anal. Chem., **47**, 219-225.
10. Ilina, E.N., Borovskaya A.D., Malakhova M.M., Vereshchagin V.A., Kubanova A.A., Kruglov A.N., Svistunova T.S., Gazarian A.O., Maier T., Kostrzewa M., Govorun V.M. (2009) J Mol. Diagn., **11**(1), 75-86.
11. Mellmann A., Cloud J., Maier T., Keckevoet U., Ramminger I., Iwen P., Dunn J., Hall G., Wilson D., Lasala P., Kostrzewa M., Harmsen D. (2008) J. Clin. Microbiol., **46**(6), 1946-1954.
12. Dubois D., Leyssene D., Chacornac J.P., Kostrzewa M., Schmit P.O., Talon R., Bonnet R., Delmas J. (2009) J. Clin. Microbiol., **48**(3), 941-945.
13. Ilina E.N., Borovskaya A.D., Serebryakova M.V., Chelysheva V.V., Momynaliev K.T., Maier T., Kostrzewa M., Govorun V.M. (2010) Rapid Commun Mass Spectrom., **24**(3), 328-334.
14. Szabados F., Woloszyn J., Richter C., Kaase M., Gattermann S. (2010) J. Med. Microbiol., **59**(Pt 7), 787-790.

15. Bessede E., Angla-Gre M., Delagarde Y., Sep Hieng S., Ménard A., Mégraud F. (2011) Clin. Microbiol. Infect, **17**(4), 533-538.
16. Yan Y., He Y., Maier T., Quinn C., Shi G., Li H., Stratton C.W., Kostrzewa M., Tang Y.W. (2011) J. Clin. Microbiol., **49**(7), 2528-2532.
17. Атрошкина М.Е., Ильина Е.Н., Плахова К.И., Гомберг М.А., Кубанова А.А., Говорун В.М. (2009) Молекулярная медицина, **3**, 23-31.
18. Stevenson L.G., Drake S.K., Shea Y.R., Zelazny A.M., Murray P.R. (2010) J. Clin. Microbiol., **48**(10), 3482-3486.
19. Anderson B. (1994) J. Fla. Med. Assoc., **81**(12), 835-837.
20. Patel J.B. (2001) Mol. Diagn., **6**(4), 313-321.
21. Ryzhov V., Fenselau C. (2001) Anal. Chem., **73**(4), 746-750.
22. Qiu F., Liu H.Y., Dong Z.N., Feng Y.J., Zhang X.J., Tian Y.P. (2009) Am. J. Biomed. Sci., **1**(1), 80-90.
23. Shevchenko V.E., Arnotskaya N.E., Zaridze D.G. (2010) Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Eng), **16**(4), 539-549.
24. Ziganshin R.H., Alexeev D.G., Arapidi G.P., Ivanov V.T., Moshkovskii S.A., Govorun V.M. (2008) Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, **2**(4), 335-342.
25. Bittar F., Ouchenane Z., Smati F., Raoult D., Rolain J.M. (2009) Int. J. Antimicrob. Agents, **34**(5), 467-470.

Поступила: 11. 01. 2012.

STRAIN DIFFERENTIATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS BY MEANS OF DIRECT MALDI TOF MASS SPECTROMETRY PROFILING

M. Kornienko¹, E. Ilina¹, A. Borovskaya¹, M. Edelstein², M. Sukhorukova², M. Kostrzewa³, V. Govorun¹

¹Research Institute for Physical-Chemical Medicine, M. Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435 Russia; tel.: +74992464570; e-mail: kornienkomariya@gmail.com

²Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

³Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany

Staphylococcus aureus - one of the most interesting for clinical studies of microbial species with extensive strain diversity, primarily due to the variability of virulence factors and pathogenicity. The aim of this study was approbation of a method for the rapid strain differentiation of *S. aureus* on the basis of bacterial cell direct protein profiling approach by means of MALDI TOF MS. Beta-lactamase and alpha-hemolysin productions, coding by the *blaZ* and *hla* genes, respectively, were selected as markers for the strain differentiation. Mathematical analysis of MALDI mass spectra from 53 isolates allowed the construction of two independent classification models that can differentiate the strains on the presence/absence of *blaZ* or *hla* genes. A number of the most significant peaks (masses), which can be considered as markers of the strain differences in *S. aureus*, were identified using a statistical contribution of each mass peak in the models. These diagnostic models differ the sensitivity and the specificity, which were 97.5% and 82.5% for the classification of strains on the basis of beta-lactamase production, and 90.0% and 88.7% by the presence of alpha-hemolysin.

Key words: *Staphylococcus*, strain differentiation, MALDI-MS.