

ШАРОВ ТИМУР НИКОЛАЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМОВ ЭКСПРЕСС-ИДЕНТИФИКАЦИИ И
БЕЛКОВОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ *COCCIDIOIDES* SPP.
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

ВОЛГОГРАД – 2017

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора.

Научный руководитель:	
Викторов Дмитрий Викторович	доктор биологических наук, доцент
Официальные оппоненты:	
Ведущая организация:	

Защита состоится «_____» _____ 2016 года в «_____» часов на заседании диссертационного совета **Д 208.008.06** при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1. E-mail: post@volgmed.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и с авторефератом на сайтах: www.volgmed.ru, www.vak2.ed.gov.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета
доктор социологических наук,
кандидат медицинских наук,
профессор

Дмитриевна

Ковалева Марина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Кокцидиоидомикоз – одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний микотической природы, вызываемое первичными грибными патогенами *Coccidioides immitis* и *C. posadasii*. В соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», возбудители кокцидиоидомикоза относятся ко второй группе патогенности (опасности).

Значимость проблемы кокцидиоидомикоза за последние десятилетия возросла не только для традиционно эндемичных регионов Америки, но и для стран, где заболевание ранее не регистрировалось. Случаи заболевания кокцидиоидомикозом имели место в Австралии, Финляндии, Новой Зеландии, Великобритании, Индии, Японии, Таиланде [Brown J., 2013, Kishi K., 2008]. Распространение этого микоза по всему миру связано, в первую очередь, с развитием туризма: большинство лиц, инфицированных микромицетами рода *Coccidioides*, заболели случайно при посещении тех стран, где микромицет присутствует в почве [Малеев В. В., 2013]. Проблема биотерроризма, обострение которой наблюдается в современном мире, требует по-новому взглянуть на возможность распространения кокцидиоидомикоза. Кроме этого, возбудители кокцидиоидомикоза попадают за пределы своего ареала с продуктами растениеводства. Также высокой опасности заражения подвергаются пациенты при пересадке органов от больных доноров [Blair J.E., 2001]. Все это указывает на существующую реальную опасность завоза в Россию этого возбудителя из эндемичных районов.

Высокая патогенность *Coccidioides* spp. для человека, отсутствие средств специфической профилактики кокцидиоидомикоза, выраженная резистентность возбудителей ко многим химиотерапевтическим препаратам требуют пристального внимания к этим микроорганизмам, прежде всего с диагностических позиций, а также с точки зрения необходимости установления источников инфекции, механизмов циркуляции возбудителей и этиологической расшифровки возможных вспышек заболевания, т.е. совершенствования существующих методик и разработки новых эффективных методов идентификации и типирования патогенных микромицетов [Fisher M.C., 2000, Fisher M.C., 2002].

Большую значимость для идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов микромицетов на современном этапе имеют разнообразные молекулярно-генетические методы. Значительным потенциалом для исследований в этой области имеют также протеомные методы анализа качественного и количественного белкового

состава клеток и экспрессии белков. С появлением высокотехнологического оборудования разрешающая способность некоторых протеомных методов исследования стала сопоставима с молекулярно-генетическими методами.

Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии показывает эффективность при изучении изолятов таких микромицетов как *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Pichia* и *Blastoschizomyces*. Масс-спектрометрический метод позволяет не только провести идентификацию вида микромицетов с высокой точностью (93 %), но и разделить штаммы внутри одного вида на группы на основании сходства белковых профилей.

В соответствии с приказом Роспотребнадзора № 88 от 17.03.2008 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора функционирует Референс-центр по мониторингу за возбудителями глубоких микозов. Одной из его задач является изучение биологических, молекулярно-генетических характеристик, а также разработка и совершенствование диагностических методов для установления видовой принадлежности возбудителей микозов.

Таким образом, исследования, направленные на дополнение схем лабораторной диагностики кокцидиоидомикоза, представляются актуальными. Комплексное использование различных методов идентификации и определения белкового профиля, позволит повысить эффективность анализа микроорганизмов в Референс-центрах по мониторингу возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и Национальных центрах верификации диагностической деятельности.

Степень разработанности проблемы

Возбудители кокцидиоидомикоза, *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* являются наиболее типичными представителями группы особо опасных микозов, в одних только США ежегодно регистрируются тысячи случаев заболевания [Sheff K.W., 2010]. Диагностика кокцидиоидомикоза включает в себя несколько возможных методов. Самый распространенный метод - это выделение чистой культуры микромицета с последующим микроскопическим анализом и получением сферической фазы для окончательного подтверждения диморфизма. Для культурального подтверждения кокцидиоидомикоза требует достаточно длительного времени. Кроме того, при диагностике тяжелых форм кокцидиоидомикоза культуры удается получить лишь в 39 % случаев при диссеминации заболевания и в 6 % - при развитии легочной формы [Johnson S.M. et al., 1996].

Иммуносерологические методы также занимают достаточно важное место в диагностике кокцидиоидомикоза, однако к их существенным недостаткам следует отнести их в целом низкую видоспецифичность [Hung et al., 2007].

В последние годы для идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза стали использовать различные молекулярно-биологические подходы, основанные на детекции консервативных последовательностей геномов (генов 18S рРНК, ITS регион, 28S рРНК) [Bialek R., 2005]. Вместе с тем, необходимо иметь в виду, что при идентификации возбудителей особо опасных микозов, основанной на детекции последовательностей рибосомальных генов, всегда имеется вероятность получения ложноположительных результатов, обусловленных высокой степенью гомологии данных нуклеотидных последовательностей у филогенетически близких микромицетов. На основании данных литературы можно сделать заключение о необходимости секвенирования всех продуктов амплификации, если в ПЦР-тест-системе используются праймеры, разработанные на основе фрагментов рибосомальных генов возбудителей микозов, в противном случае можно столкнуться с ложноположительными результатами, в частности, при исследовании объектов внешней среды [Anstead G.M., Graybill J.R., 2006].

По мнению многих исследователей, масс-спектрометрический метод идентификации патогенных микроорганизмов, в том числе, и клинически значимых микромицетов, является важным и полезным инструментом в клинической и исследовательской практике, не уступающим по своей разрешающей способности молекулярно-генетическим методам [Hillenkamp F., 2013]. Существенным ограничивающим фактором более широкого использования данного метода идентификации в отношении возбудителей особо опасных микозов является практически полное отсутствие их характеристических мас-спектров в существующих базах данных.

Цель и задачи исследования

Цель работы заключалась в разработке алгоритмов экспресс-идентификации и белкового профилирования видов *Coccidioides* на основе сравнительного анализа MALDI-TOF масс-спектров клеточных белков

Задачи

1. Разработать комплекс методических приемов обработки клеток *Coccidioides*, сочетающий обеззараживание и выделение белковых компонентов для исследования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.
2. Получить репрезентативный набор характеристических масс-спектров коллекционных штаммов *Coccidioides*.

3. Разработать раздел, дополняющий электронную базу данных SARAMIS масс-спектрами для идентификации и белкового профилирования изолятов *Coccidioides*.
4. Разработать дополнения к схемам идентификации возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической деятельности методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Научная новизна и теоретическая значимость

Впервые разработан комплекс методических приемов пробоподготовки, обеспечивающий необходимый уровень безопасности работ при MALDI-TOF масс-спектрометрии клеток *Coccidioides* spp.

Впервые исследована вариабельность MALDI-TOF спектров клеток штаммов *Coccidioides* spp. при различных условиях культивирования и даны рекомендации по достижению воспроизводимости получения масс-спектров исследуемых микромицетов.

Впервые сформированы референтные масс-спектры видов *Coccidioides* и разработан раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров SARAMIS™ для идентификации и типирования изолятов *Coccidioides* spp.

Впервые проведена паспортизация коллекционного фонда штаммов *Coccidioides* spp. на основе MALDI-TOF масс-спектрометрии клеточных белков.

Разработанные алгоритмы экспресс-идентификации и типирования видов *Coccidioides* на основе сравнительного анализа характеристических MALDI-TOF масс-спектров клеточных белков предложены в качестве дополнений к схемам молекулярного типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической деятельности.

Практическая значимость

В основе диссертационной работы лежат исследования, выполненные соискателем в рамках 2 тем НИР по плану Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории РФ (КНС 48.00) и Отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» на 2011-2015 гг.

Материалы исследований в рамках диссертационной работы были использованы при разработке разделов проектов методических указаний «Идентификация и типирование возбудителей особо опасных инфекционных болезней методом MALDI-TOF MS на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической

деятельности», МУ «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики возбудителей особо опасных микозов для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», методических рекомендаций МР 4.2.0089-14 "Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для индикации и идентификации возбудителей I - II групп патогенности" (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 24 апреля 2014 г.), а также при составлении ряда нормативно-методических документов учрежденческого уровня внедрения.

Разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования методические приемы и аналитические алгоритмы используются для паспортизации и углубленного изучения свойств штаммов патогенных микромицетов в лабораториях Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями особо опасных микозов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанный метод пробоподготовки клеток *Coccidioides* для MALDI-TOF масс-спектрометрии, основанный на обработке клеточной массы раствором трифторуксусной кислоты, ацетонитрилом в сочетании с интенсивным механическим воздействием на мицелий микромицетов, обеспечивает как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов.
2. Культивирование клеток исследуемых видов микромицетов в течение 7 ± 2 суток при 27°C на плотной питательной среде Сабуро обеспечивает высокие воспроизводимость и качественные характеристики клеточного масс-спектра.
3. Микромицеты рода *Coccidioides* характеризуются выраженным межвидовым и внутривидовым полиморфизмом белкового состава клеток, с варьированием степени сходства масс-спектров штаммов в пределах 60 – 70 %. Области масс-спектров 6000 - 10000 m/z и 4000 - 6000 m/z являются основными по частоте встречаемости спектральных пиков, характеризуются стабильным компонентным составом и могут служить основой формирования родового и видового референтных «суперспектры» исследуемых микромицетов.
4. Сформированный раздел базы данных референтных MALDI-TOF спектров SARAMIS (род *Coccidioides*, порядок *Onygenales*, класс *Eurotiomycetes*, отдел *Ascomycota*, царство *Fungi*, домен *Eucariota*), позволяет проводить видовую идентификацию штаммов видов *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* с

необходимым уровнем достоверности.

Апробация результатов работы

Основные положения диссертации были представлены и обсуждены на ряде научно-практических конференций специалистов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (2013 – 2016), 79-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2014), VI Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2014), а также были представлены в печатных материалах конференций Национальной конференции микологии (УФА, 2013) и Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVIII Кашкинские чтения, Санкт-Петербург, 2015).

Публикации по теме диссертации

По материалам исследования опубликовано 9 печатных работ, отражающих основное содержание работы, в том числе 4 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, издана 1 монография.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 120 листах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 162 источников, в том числе 2 отечественных и 160 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 20 рисунками.

Личный вклад соискателя

Личный вклад соискателя в диссертационную работу является основным. Теоретическое обоснование работы и использованные в ней методологические подходы разработаны лично автором под руководством доктора биологических наук, доцента Викторова Д.В. Автором самостоятельно подготовлен обзор литературы по проблеме, разработаны методы пробоподготовки клеток возбудителей кокцидиоидомикоза для масс-спектрометрического профилирования, получены референтные масс-спектры видов *Coccidioides* и разработан раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров для идентификации и типирования изолятов, проведена оценка возможности применения масс-спектрометрического метода для внутривидовой дифференциации исследуемых микромицетов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования. Объектами исследования служили 11 штаммов *C.immitis*, 15 штаммов *C. posadasii*, 6 штаммов *Fusarium* spp, 4 штамма *Candida* spp. и 6 штаммов *Cryptococcus neoformans*. Работу с перечисленными микроорганизмами проводили в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Для изучения влияния условий культивирования исследуемых микромицетов на качество и воспроизводимость масс-спектральных характеристик их клеток, штаммы *Coccidioides* spp. выращивали на агаре Сабуро, картофельном агаре, а также агаре Чапека-Докса. Для культивирования штаммов *Candida*, *Fusarium* и *Cryptococcus* использовали только агар Сабуро.

Методы пробоподготовки. Для оценки качества и воспроизводимости масс-спектров культур *Coccidioides* применяли стандартный протокол обеззараживания 0.5 % раствором мертиолята натрия, с последующей экстракцией белковых компонент с использованием муравьиной кислоты и ацетонитрила, метод обеззараживания микромицетов и экстракции клеточных белков с помощью 80 % трифторуксусной кислоты, а также модифицированный метод пробоподготовки, основанный на обработке клеточной массы раствором трифторуксусной кислотой, ацетонитрилом в сочетании с интенсивным механическим воздействием на мицелий микромицетов, обеспечивающий как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов.

Для масс-спектрометрического исследования микромицетов III-IV групп патогенности использовали стандартный метод пробоподготовки, включающий обработку абсолютным этанолом и экстракцию белков 70 % муравьиной кислотой и ацетонитрилом.

В качестве матрицы для MALDI-TOF MS использовали α -циано-гидроксикоричную кислоту в растворе 50 % ацетонитрила и 2,5 % трифторуксусной кислоты.

Получение масс-спектров. Регистрацию масс-спектров осуществляли на приборе Axima Performance (Shimadzu, Япония) с азотным лазером. Диапазон регистрации составлял 1000-15000 m/z, фиксировались только положительные ионы, суммарный спектр каждого образца составлялся на основе 100 единичных выстрелов. Калибровка масс-спектрометра проводилась с использованием стандартного видового масс-спектра *Escherichia coli* CCUG (основные пики масс-спектра 4365, 5096, 5381, 6241, 6255, 6311, 6411, 6856, 7158, 7274, 7872, 9742, и 12227 кДа).

Формирование пиков осуществляли в режиме развернутых настроек. Показатель смещения базовой линии составлял 0,1 мВ. Величина базового порога составляла 100 каналов, ниже этой величины сигналы учитывались как шум.

Результирующий спектр каждого штамма экспортировали в базу данных SARAMIS™ v. 3.62 (Anagnostec GmbH) для последующего анализа. При анализе учитывались количество пиков, их интенсивность и места расположения, а также общая величина шумового компонента. Пост-обработки спектра не проводилось, и с базой данных сверялись все масс-пики выше заданного значения. Для анализа масс-спектров с помощью программного обеспечения «mMass» (v.5.5), их переводили в формат .mzData.

ОСНОВНЫЕ ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Подбор метода пробоподготовки *C. immitis* и *C. posadasii*. Перед основными этапами работы, была проведена оптимизация алгоритма пробоподготовки клеточного материала патогенных микромицетов для масс-спектрометрического анализа. Первоначально проводили оценку качества и воспроизводимости масс-спектров культур *Coccidioides*, полученных с применением стандартного протокола обеззараживания 0.5 % раствором мертиолята натрия. На всех полученных спектрах отмечалась группа нечетких пиков средней и низкой интенсивности в диапазоне 3-4 kDa, сливающихся друг с другом. Типичная для этого метода картина распределения пиков представлена на рисунке 1.

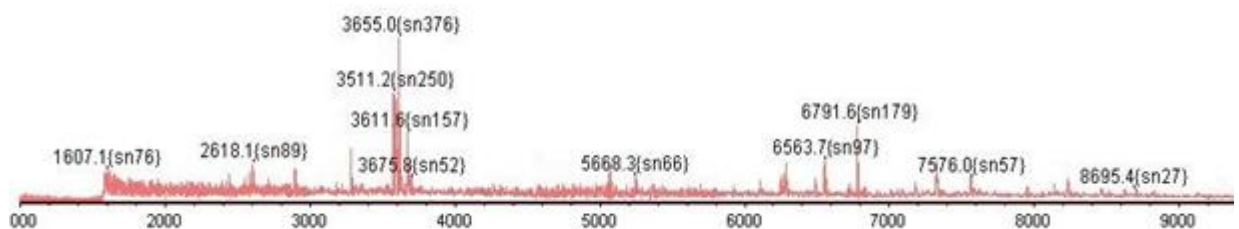


Рисунок 1. Масс-спектр *C. immitis* 441 после стандартного протокола обеззараживания 0.5 % раствором мертиолята натрия. Высокоинтенсивные и узкие пики, необходимые для сопоставления с базой данных отсутствуют.

Предположительно это связано с тем, что в процессе пробоподготовки не происходило полного разрушения клеток микромицета, вследствие чего пики на спектрах соответствуют ионам не только белковой природы, но и другим компонентам клеточной стенки, например, хитину и другим полисахаридам.

Следующий апробированный метод заключался в экспозиции 50 мг образца мицелия в 80%-м растворе трифторуксусной кислоты 1 течение 30 мин. Характерным признаком обработки микромицетов трифторуксусной кислотой являлось наличие на спектрах одного или двух очень высоких пиков на фоне достаточно интенсивного

шумового сигнала. Трифторуксусная кислота разрушает часть белков и способствует образованию значительного числа многозарядных фрагментов с низкой интенсивностью. А высокие пики соответствовали белкам, изначально присутствующим в клетке в большом количестве, поэтому не столь сильно страдающим от воздействия трифторуксусной кислоты.

В результате этого показана высокая эффективность метода при обеззараживании, однако фактического улучшения качества масс-спектра при этом отмечено не было, что отображено на рисунке 2.

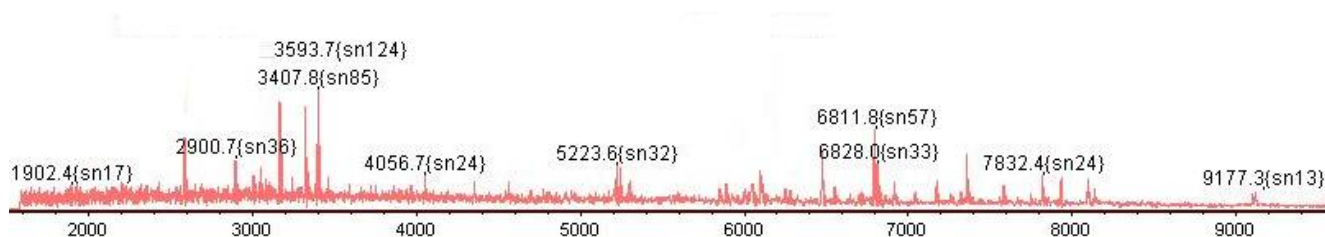


Рисунок 2. Масс-спектр *C. immitis* 441 после обеззараживания в 80%-м растворе ТФК. Пики в диапазоне 3000-4000 m/z более выражены, однако общая интенсивность сигналов не возросла.

Следующим, использованным в рамках исследования методом пробоподготовки, был метод экстракции белков ацетонитрилом и муравьиной кислотой, после предварительной обработки этанолом. Раствор муравьиной кислоты был заменен на раствор трифторуксусной кислоты с целью сделать их пригодными для пробоподготовки *Coccidioides* spp., поскольку муравьиная кислота не оказывала достаточного обеззараживающего эффекта на клетки данного микромицета.

В дополнение к трифторуксусной кислоте, в пробирки с образцами культур добавляли стеклянные гранулы ($d = 45$ мкм) для механического воздействия на клеточную стенку гриба, после чего образцы прогревали в течение 10 минут при 40°C . В результате, наблюдалось значительное визуальное улучшение качества спектров по сравнению с первоначальным протоколом. Уровень шума был меньше, а количество и интенсивность пиков возросли. При этом результаты посева на стерильность материала, обработанного данным методом, во всех экспериментах были отрицательными.

В итоге, после оптимизации и испытания нескольких методов пробоподготовки клеток *Coccidioides* spp., для масс-спектрометрии наиболее подходящим был признан дополненный метод экстракции с использованием трифторуксусной кислоты и ацетонитрила с последующим прогреванием и механическим воздействием на мицелий. Данная схема пробоподготовки позволяла получить масс-спектры с более высоким

качеством и воспроизводимостью по сравнению с другими методами, отображено на рисунке 3.

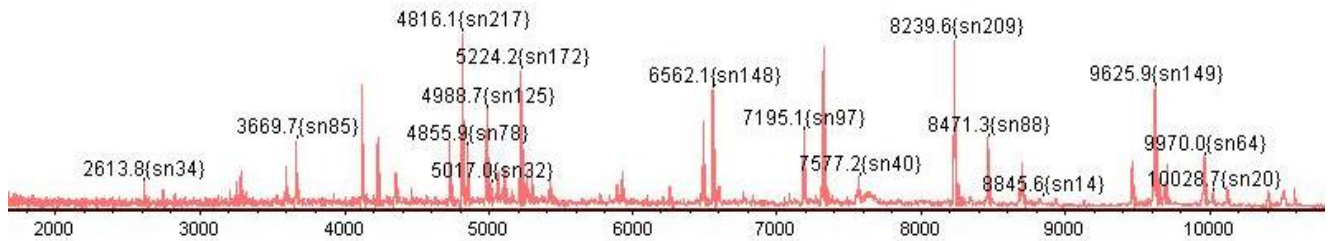


Рисунок 3. Масс-спектр *C. immitis* 441 после протокола обеззараживания в 80%-м растворе ТФК с экстракцией МК и ацетонитрилом, и последующим прогреванием в течение 10 минут. Визуально можно отметить большое количество высокоинтенсивных и четких пиков.

Получение и анализ репрезентативного набора масс-спектров коллекционных штаммов *Coccidioides*. В идентификационной базе данных клеточных масс-спектров видов бактерий и микромицетов SARAMIS v. 3.62 отсутствовали референтные масс-спектры возбудителей особо опасных микозов, в том числе возбудителя кокцидиоидомикоза, вследствие чего сопоставить с ними полученные спектры не представлялась возможным. Поэтому одной из целей работы было создание соответствующего подраздела базы данных (на уровне семейства *Onygenaceae*) масс-спектров исследуемых микроорганизмов и формирование наборов спектров и родового суперспектра, используемых в дальнейшем в качестве референтных при идентификации и белковом профилировании штаммов микромицетов.

Для масс-спектров штаммов *Coccidioides* характерны значительные визуальные различия, что характерно для масс-спектров некоторых других микромицетов. Можно выделить несколько диапазонов m/z , где чаще всего группируются наиболее интенсивные пики.

Первой по частоте встречаемости пиков с показателем s/n выше 30 была зона масс-спектров в диапазоне от 6000 до 10000 m/z (штаммы *C. immitis* 34, 46, 46-Р, 158, 5960, и С-5, а также *C. posadasii* 22, 24, 442, А-1, В-13, В-475, 36794). Вторая зона располагается в интервале от 4000 до 6000 m/z (штаммы *C. immitis* 4 и 46-Н, *C. posadasii* 7/86, 36-S, 51, 27567, 37688). Кроме того, масс-спектры части штаммов (*C. immitis* 333, 441, 30881, а также *C. posadasii* 30883, 95271, и М-11) содержали равноценные по интенсивности пики в обоих интервалах. Механизм подобного группирования пока неясен, однако, наиболее

интенсивные пики хорошо воспроизводимы, лишь с незначительными вариациями по местоположению и величине.

Программный анализ установил степень взаимного сходства масс-спектров в пределах 60-70%. Подобный результаты, в сочетании со значительными визуальными отличиями в распределении пиков индивидуальных масс-спектров, свидетельствуют о наличии существенного разнообразия белковых компонентов внутри рода *Coccidioides*.

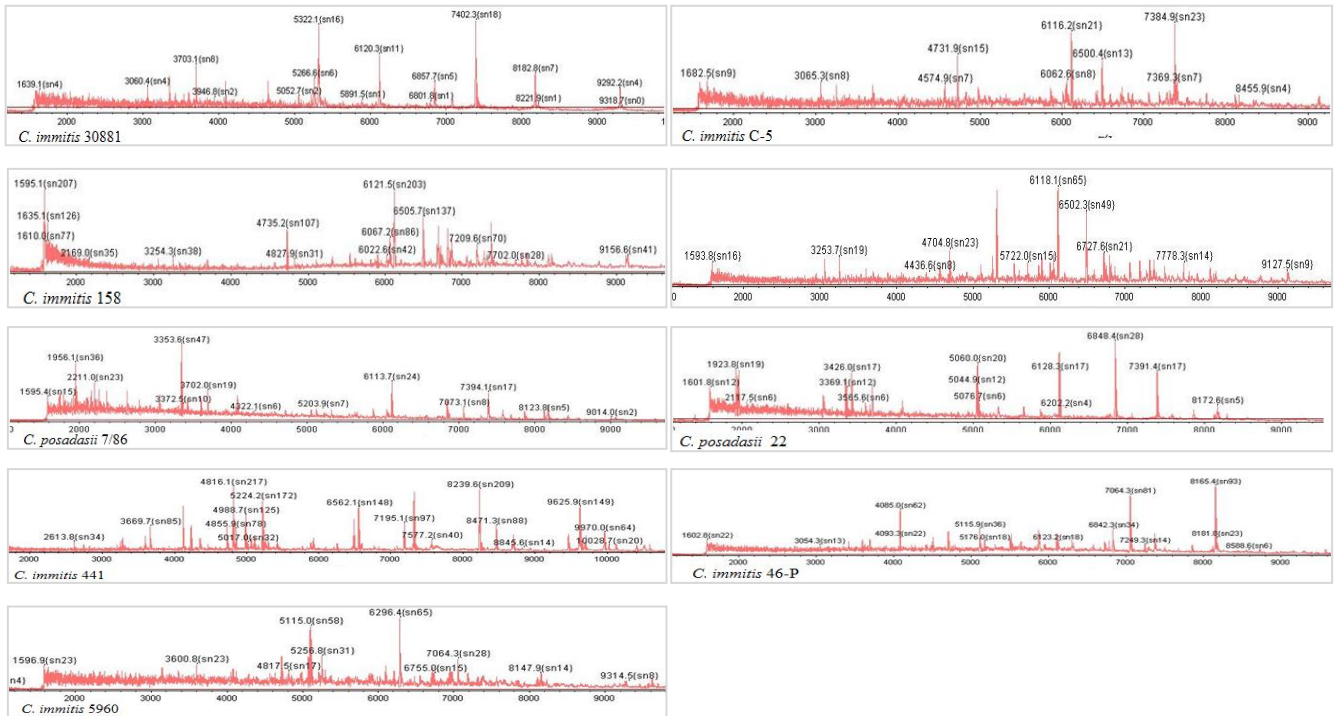
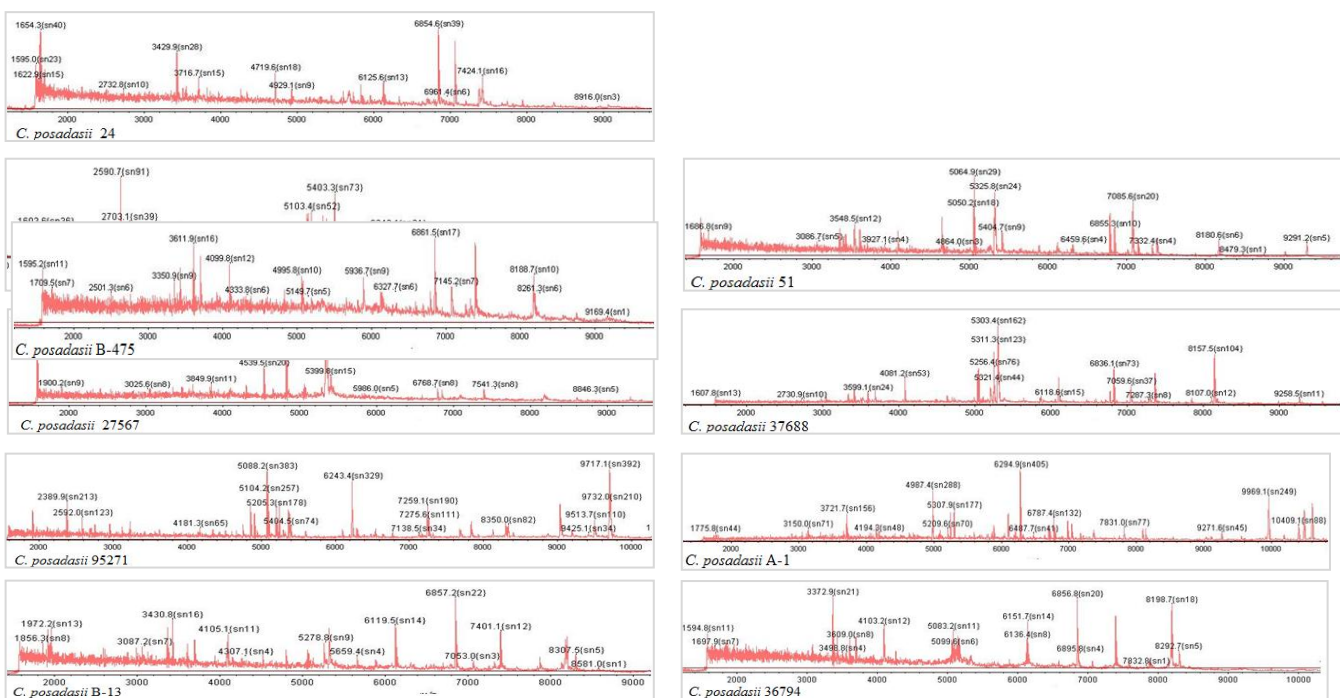


Рисунок 4. Масс-спектры *C. immitis*.



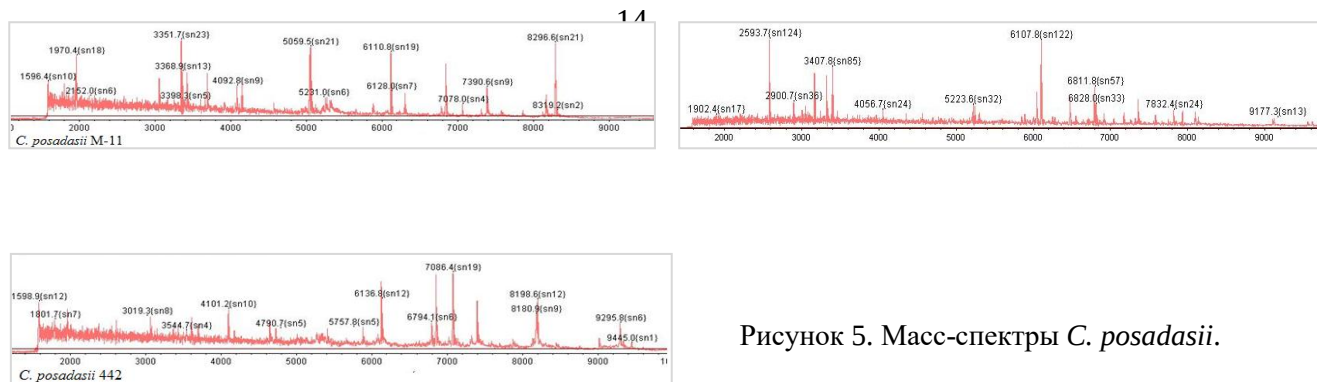


Рисунок 5. Масс-спектры *C. posadasii*.

Изучение влияние условий культивирования микромицетов на характеристики масс-спектров. Для изучения влияния условий культивирования исследуемых микромицетов на воспроизводимость масс-спектральных характеристик их клеток, штаммы *Coccidioides* spp. выращивали на агаре различных питательных средах. Также варьировали время культивирования на питательной среде (7, 10 и 14 суток).

Оптимальным для получения наиболее воспроизводимых масс-спектров по соотношению время роста/качество спектра был признан срок 7 суток. При культивировании в течение 10 суток, качество полученных масс-спектров либо не отличалось от 7-суточных, либо было в незначительной степени ниже. Масс-спектры штаммов, культивируемых в течение 14 суток, демонстрировали существенное снижение качества. На рисунке 6 проиллюстрирован уровень воспроизводимости масс-спектров на примере штамма *C. posadasii* 51 после культивирования штамма микромицета на среде Чапека-Докса. Как видно, визуальные различия масс-спектра незначительны, и общая картина величины и распределения масс-пиков сохраняется. Такая же картина наблюдается и при культивировании этого штамма на картофельном агаре на рисунке 7. Временной интервал между экспериментами составлял 30 суток.

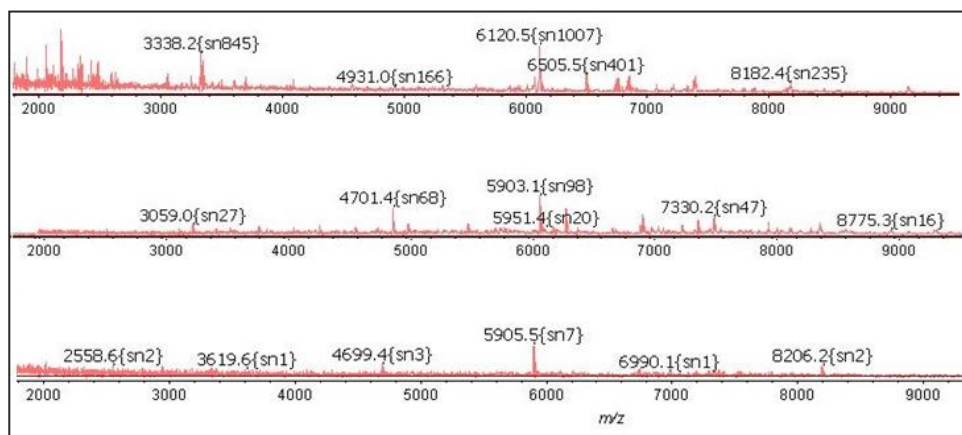


Рисунок 6. Масс-спектры штамма *C. posadasii* 51 после выращивания на среде Чапека-Докса. Как видно, практически отсутствует как шумовой сигнал, так и информативные пики.

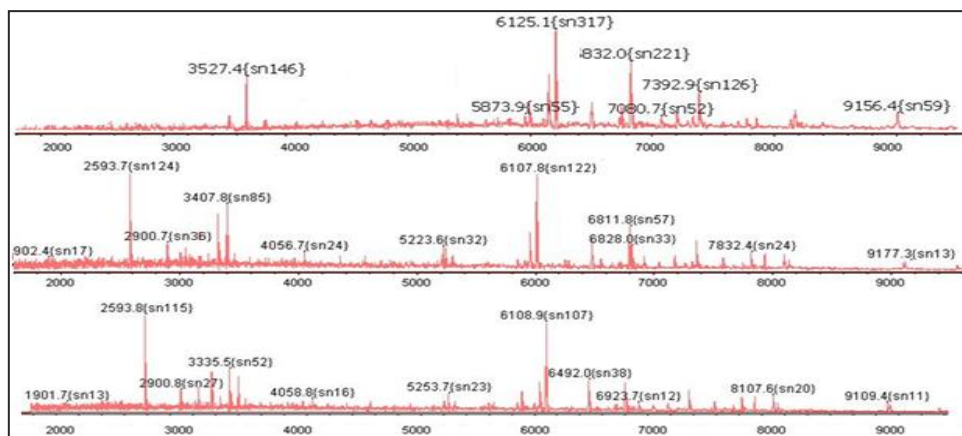


Рисунок 7. Масс-спектры штамма *C.posadasii* 51 после выращивания на картофельном агаре. Можно отметить более высокое качество спектра, по сравнению со средой Чапека-Докса.

При культивировании на картофельном агаре и агаре Чапека-Докса воспроизводимость масс-спектров также оказалась достаточно высокой. Изменения местоположения наиболее интенсивных пиков находились в диапазоне $\pm 0,3$ кДа. Колебания соотношения s/n не превышали 200 единиц.

Однако качество масс-спектров культур, выращенных на картофельном агаре и среде Чапека-Докса, оказалось существенно ниже, нежели при культивировании на плотной среде Сабуро. На рисунке 8 представлены результаты сравнения масс-спектров штаммов, выращенных на трех разных средах на примере штамма *C. posadasii* M-11.

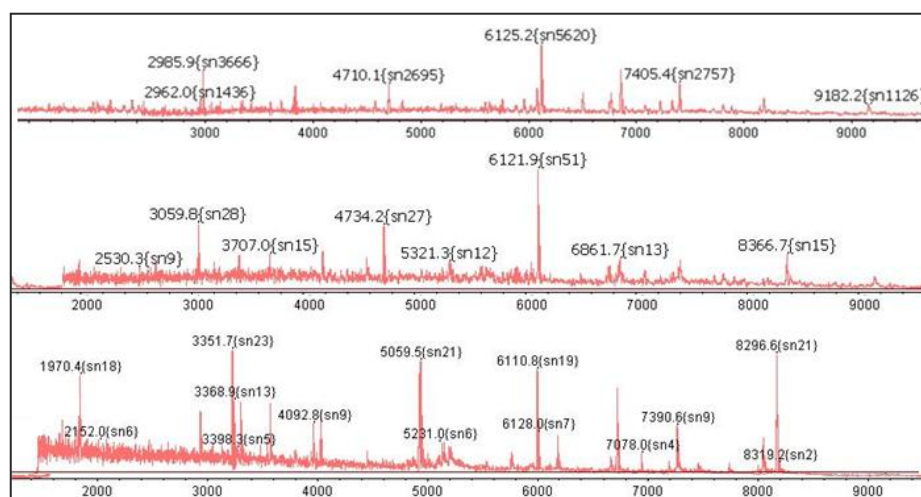


Рисунок. 8. Масс-спектры штамма *C.posadasii* M-11, после культивирования на агаре Чапека-Докса, картофельном агаре, и Сабуро. Визуальное сравнение показывает отчетливое и значительное улучшение качества масс-спектра, а, следовательно, оптимальную среду для выращивания.

Установлено, что оптимальной питательной среда, для культивирования микромицетов рода *Coccidioides* с целью получения масс-спектров с узкими и интенсивными пиками, иотсутствием значительного шумового сигнала, с условием наибольшей воспроизводимости распределения пиков является плотный агар Сабуро. Также было показано незначительное влияние температуры культивирования на результаты масс-спектрометрического анализа.

Идентификация родо- и видоспецифичных пиков клеточных масс-спектров микромицетов рода *Coccidioides*. Разработка раздела базы данных масс-спектров SARAMIS™ для идентификации штаммов *Coccidioides spp.* Одной из конечных целей проводимой работы было дополнение существующей базы данных SARAMIS характеристическими масс-спектрами микромицетов рода *Coccidioides*. После регистрации масс-спектров, в рабочем пространстве программы был создан их каталог, соответствующий штаммам двух видов: *Coccidioides immitis* (11 спектров) и *Coccidioides posadasii* (15 спектров).

На первом этапе сбора данных в сумме было получено порядка 190 индивидуальных масс-спектров, различающихся по качеству и составу масс-пиков, часть из которых затем группировали для получения видовых, и родового масс-спектров. Из них было отобрано 130 масс-спектров, соответствующих 26 используемым штамма *Coccidioides*. Далее эти масс-спектры были преобразованы в общий массив, содержащий координаты всех масс-пиков всех штаммов. С помощью инструментов программы были отсеяны значения, встречающиеся менее чем в половине масс-спектров обоих видов. Аналогичная работа была проделана с массивами масс-пиков 15 штаммов *C. immitis* и 11 штаммов *C. posadasii*.

После пост-обработки массивов всех идентифицированных масс-пиков, на следующем этапе были рассчитаны и созданы «суперспектры» каждого вида, а также родовой «суперспектр». Для формирования каждого из видовых суперспектров объединяли по 20 индивидуальных масс-спектров. Родовой суперспектр был получен объединением 40 отдельных масс-спектров. В результате, из полученных масс-спектров был сформирован раздел базы данных SARAMIS, позволяющий проводить идентификацию и хемотипирование возбудителей кокцидиоидомикоза. Отдельные масс-спектры штаммов, родовой и видовые суперспектры были помещены в вид *Coccidioides*, порядок *Onygenales*, класс *Eurotiomycetes*, отдел *Ascomycota*, царство *Fungi*, домен *Eucariota*.

Далее каждый из индивидуальных масс-спектров исследуемых штаммов *Coccidioides* spp. был сопоставлен в режиме «Идентификация» с полной базой данных характеристических масс-спектров SARAMIS™ (7500 видов бактерий и микроскопических грибов). Показатели достоверности идентификации коллекционных штаммов *Coccidioides* spp. с помощью сгенерированных суперспектров варьировались от 74 до 95 %. Наиболее высокий процент совпадений, как и ожидалось, был с родовым спектром (≥ 90 %) (рис. 9).

	Name	Masses	Matches (%)	Genus	Family	Order	Class	Phylum
►	441	648	91.8	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	46	430	95.4	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	30889	478	91.9	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	46-P	479	95.8	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	36-S	408	91.6	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	A-1	382	91.2	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	30881	241	97.3	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	158	354	90.3	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	24	292	94.3	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	333	281	94.9	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	46-H	374	90.7	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	34	308	90.4	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	37688	218	90.7	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	4	246	94.4	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	7-86	290	95	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	442	240	90.6	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	5960	215	90.5	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	22	362	94.7	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	51	451	95.2	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	B-13	341	90.5	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	C-5	201	90.4	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	M-11	232	94.2	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	36794	232	90.5	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	B-475	331	99.8	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	95271	254	94.3	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco
	28	314	92.5	Coccidioides	Family Onyge	Order Onyge	Class Eiasco	Division Asco

Рисунок 9. Процентный показатель совпадения масс-спектров исследованных штаммов *Coccidioides* spp. с родовым суперспектром.

В таблице 1 приведены результаты масс-спектрометрической идентификации штаммов *Coccidioides* до вида.

Из двух видов, штаммы *C. posadasii* идентифицировались с большей степенью достоверности, вероятно, из-за большей количественной доли масс-спектров этого вида во всех суперспектрах.

Следует отметить, что удаление из общего первичного массива масс-спектров наиболее (в районах 5000, 10000, 11000 m/z), или наименее интенсивных (в интервале 3000-5000 m/z), лишь незначительно снижало достоверность идентификации. Это может свидетельствовать о том, что доля масс-пииков со средней интенсивностью преобладает

над высоко- и низкоинтенсивными пиками, и именно среднеинтенсивные пики служат основой для сравнения с базой данных, по крайней мере в случае с SARAMIS.

Таблица 1.

Процентный показатель совпадения масс-спектров *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* с сформированными видовыми суперспектрами

штаммы <i>C. immitis</i>	Достоверность идентификации (%)	штаммы <i>C. posadasii</i>	Достоверность идентификации (%)
441	76,4	A-1	92,2
46	75,4	M-11	96,9
46-P	81,8	B-13	88,2
30881	81,3	22	89,7
158	80,9	24	98,8
333	75,2	51	98,4
46-H	78,9	7/86	90,5
34	84,4	442	90,6
4	77	B-475	90,8
5960	90,9	27567	96,5
C-5	78,4	37686	90,8
		95271	94,8
		30883	95,6
		36-S	93,2
		36794	94,5

Анализ возможности использования масс-спектрометрического профилирования штаммов *Coccidioides spp.* для внутривидового типирования возбудителей. В данном разделе работы была исследована применимость MALDI-TOF масс-спектрометрии клеточных белков штаммов различных видов *Coccidioides* для внутривидового типирования изолятов микромицетов. С этой целью была определена задача оценки межштаммовой вариабельности тех или иных регионов масс-спектров и частот встречаемости различных групп масс-пиков у анализируемых штаммов.

С помощью программы mMass (v.5.5.0) был проведен анализ наиболее типичных масс-спектров штаммов *C.immitis* и *C. posadasii*.

Анализ масс-спектров группы штаммов *C. immitis* позволил выявить 9 основных областей, в которых группировались пики средней интенсивности, с близким показателем m/z (рис. 10). Большая часть этих областей располагалась в диапазоне 1000-4000 m/z (1224, 1520, 1985, 3101, 3814), а остальные - в районе 7000-9000 m/z (7055, 7484, 7751,

8964). В этих областях масс-спектров у 8 - 11 штаммов (88-100 %) располагались пики с показателем относительной интенсивности 15-50%, и разбросом $m/z \pm 2$.

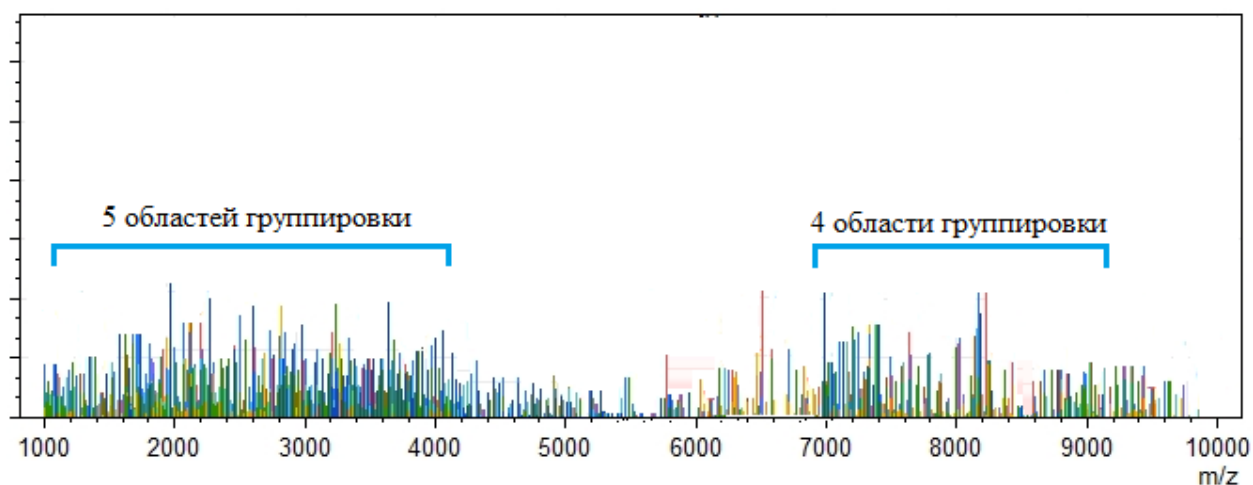


Рисунок 10. Анализируемая совокупность масс-спектров штаммов *C. immitis*.

При анализе масс-спектров группы штаммов *C. posadasii* было выявлено 12 областей группирования, 8 из которых были расположены на участке от 6000 до 9000 m/z (6647, 6860, 7077, 7390, 7724, 8177, 8359, 8760), и 4 - на участке 1000-4000 m/z (1759, 2324, 2958, 3302) (рис. 11). Находящиеся в этих зонах масс-пики обнаруживались у 10-13 штаммов (73-84 %).

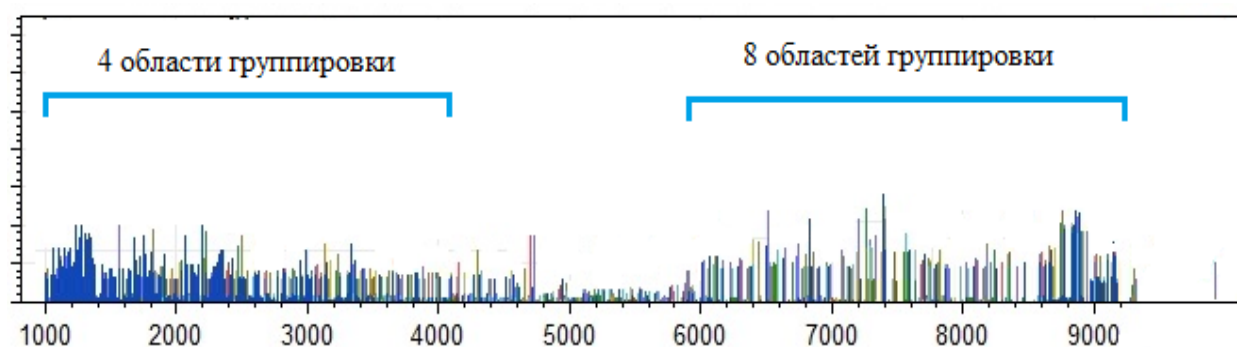


Рисунок 11. Анализируемая совокупность масс-спектров *C. posadasii*

Сопоставление, таким образом, масс-спектров всех 26 штаммов демонстрирует наличие как минимум 15 областей группирования масс-пиков на всем диапазоне измерения от 1000 до 9000 m/z , с координатами, близкими к вышеперечисленным группам обоих видов. Отмечено, что при взаимном сравнении штаммов *Coccidoides* spp., количество групп схожих масс-пиков увеличивается, а число штаммов, составляющих эти

группы уменьшается. На данный момент, однако, нет возможности определить, всегда ли пропорциональны эти изменения.

Увеличение разброса m/z вело к росту областей группирования схожих масс-пиков, однако дальнейшее превышение допустимого порога погрешности не представлялось целесообразным. В целом можно сказать, что результаты анализа масс-спектров программным обеспечением mMass давали во многом сходную картину с результатами кластерного анализа, выполненного средствами SARAMIS. Основным моментом было то, что в отличие от SARAMIS, работа в mMass проводилась не на сгенерированных «суперспектрах», а на отдельных, хотя и наиболее типичных масс-спектрах. Проведенный анализ также демонстрирует, что несмотря на наличие воспроизводимых и интенсивных масс-пиков, отмечаемых на спектрограмме визуально, низко- и среднеинтенсивные пики вносят значительный вклад в картину взаимного распределения штаммов при кластерном анализе.

В целом, по нашему мнению, полученные результаты являются достаточно убедительным подтверждением возможности использования масс-спектрометрического профилирования для оценки межштаммового сходства/различия.

ВЫВОДЫ

1. Разработан комплекс методических приемов пробоподготовки клеток возбудителя кокцидиомикоза для MALDI-TOF масс-спектрометрии. Установлено, что наиболее эффективным методом пробоподготовки, обеспечивающим как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов, является обработка раствором трифторуксусной кислоты и ацетонитрилом в сочетании с интенсивным механическим воздействием на мицелий микромицетов.
2. Исследовано влияние условий культивирования микромицетов на воспроизводимость масс-спектрометрических характеристик. Определено, что оптимальной схемой культивирования *Coccidioides* spp., обеспечивающей достаточный уровень воспроизводимости и высокие качественные характеристики клеточного масс-спектра (отклонения координат наиболее интенсивных пиков не более 0.3 кДа, колебания соотношения s/n не более 20 единиц) является выращивание клеток микромицетов в течение 7 ± 2 суток при 27°C на плотной питательной среде Сабуро.
3. Установлено, что диапазоны масс-спектров 6000 - 10000 m/z и 4000 - 6000 m/z являются преобладающими по частоте встречаемости спектральных пиков со значениями $s/n > 30$ и характеризуются стабильным компонентным составом. В целом, показатели взаимного сходства масс-спектров штаммов видов *Coccidioides* варьируют в

пределах 60 – 70 %, что свидетельствует о существенном как межвидовом, так и внутривидовом полиморфизме белковых компонентов клеток микромицетов рода *Coccidioides*.

4. На основе анализа родо- видо- и штаммоспецифических компонентов масс-спектров консервативных клеточных протеинов 11 коллекционных штаммов *C. immitis* и 15 коллекционных штаммов *C. posadasii* сформированы родовой и видовые референтные «суперспектры» исследуемых микромицетов, содержащие набор наиболее характерных и стабильно воспроизводимых спектральных пиков в анализируемом диапазоне молекулярных масс.
5. Разработан собственный раздел электронной базы данных референтных MALDI-TOF спектров SARAMIS™ (вид *Coccidioides*, порядок *Onygenales*, класс *Eurotiomycetes*, отдел *Ascomycota*, царство *Fungi*, домен *Eucariota*), позволяющий проводить видовую идентификацию штаммов видов *Coccidioides* с приемлемой достоверностью в диапазоне 74 - 95 %.
6. Выявленные особенности консервативных и вариабельных областей клеточных масс-спектров видов *Coccidioides* spp. могут быть использованы в качестве дополнительных маркеров при паспортизации и внутривидовом типировании штаммов особо опасных микромицетов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Шаров Т.Н.** Сравнительная характеристика методов типирования микроскопических грибов (обзор) / Т.Н. Шаров, М.А. Гришина, Г.А. Ткаченко, И.М. Шпак // Проблемы медицинской микологии. - 2012. Т. 14, № 2. - С. 18-24. (**журнал из перечня ВАК**).
2. Вьючнова Н.В. Активность некоторых дезинфектантов в отношении возбудителя кокцидиоидоза / Н.В. Вьючнова, В.А. Спиридонов, М.А. Гришина, А.М. Маркин, **Т.Н. Шаров**, В.А. Антонов // Проблемы медицинской микологии. - 2014. - Т. 16, № 1. - С. 36-39 (**журнал из перечня ВАК**).
3. **Шаров Т.Н.** Стандартизация протоколов пробоподготовки для исследования особо опасных микромицетов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии / Т.Н. Шаров, Н.В. Вьючнова, А.М. Маркин, Д.В. Викторov // Успехи медицинской микологии. - 2014. - Т. 13. - С. 22-24. (**журнал из перечня ВАК**)
4. Особо опасные микозы / под ред. В. В. Малеева. Авторы: В.А. Антонов, А.В. Липницкий, В.С. Лесовой, М.А. Гришина, Г.А. Ткаченко, Д.В. Викторov, Н.В. Вьючнова, И.М. Шпак, **Т.Н. Шаров**, А.М. Маркин, Е.Н. Кочубеева. – В.: Волга-Паблицер, 2013. – 193 с.

5. Маркин А.М. Моделирование процесса конверсии *Coccidioides posadasii in vitro* и применение данного подхода для идентификации возбудителя кокцидиоидомикоза / А.М. Маркин, Н.В. Вьючнова, **Т.Н. Шаров** // Успехи медицинской микологии. - 2013. - Т. 11. - С. 35-37. (**журнал из перечня ВАК**)
6. **Шаров Т.Н.** Сравнительный анализ различных методов пробоподготовки микромицетов 2-й группы патогенности для их последующей идентификации методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) / Т.Н. Шаров, М.А. Гришина, А.М. Маркин // Успехи медицинской микологии. - 2013. - Т. 11. - С. 57-59. (**журнал из перечня ВАК**)
7. Липницкий А.В. Современные представления об иммунитете при кокцидиоидомикозе / А.В. Липницкий, М.А. Гришина, **Т.Н Шаров**. // Инфекционные болезни - 2013.- Т. 11, № 2.- С. 64-68. (**журнал из перечня ВАК**)
8. Антонов В.А. Возбудители кокцидиоидомикоза в аспекте противодействия биотерроризму / В.А. Антонов, А.В. Липницкий, М.А. Гришина, **Т.Н. Шаров** // Биозащита и биобезопасность - 2014.- Т. 6, № 1.- С. 46-51. (**журнал из перечня ВАК**)