

Применение платформы *iD<sup>plus</sup>* в биологии

*iD<sup>plus</sup>*





Дрожжи

Вторичные  
метаболиты

Маркеры  
резистентности

Структурная  
идентификация

Токсины



Take Analysis Further™

# Идентификация микроорганизмов

Быстрая идентификация микроорганизмов: 1-2 минуты

Идентификация и классификация на основании их фенотипа

Обширная наполненная база данных

Открытая база данных — простое добавление новых видов

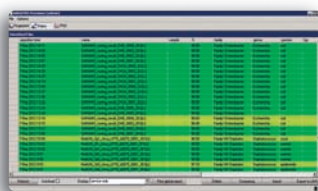
Концепция SuperSpectrum™ для обеспечения надежности

Иерархическая классификация

Кластерный анализ



**iD<sup>plus</sup>**



**Идентификация**

Take Analysis Further™

# Идентификация микроорганизмов

Листериоз — это болезнь пищевого происхождения, первично вызываемая бактерией *Listeria monocytogenes*. В основном заболевание поражает группы риска (беременных женщин, новорожденных, лиц с ослабленным иммунитетом и пожилых людей). Хотя оно встречается относительно редко, но может угрожать жизни, приводя к бактериемии, сепсису, менингиту и осложнениям течения беременности, таким как выкидыши и невынашивание.



Что совершенно необычно, бактерии могут развиваться при температуре замораживания, и вспышки роста *Listeria monocytogenes* наблюдались на различных пищевых продуктах, от готовых к употреблению мясных деликатесов, паштетов и копченых морепродуктов, до непастеризованного молока и молочных продуктов, например мягкого сыра.

Рисунок 1: *Listeria monocytogenes*

Время выполнения используемых в настоящее время методик, основанных на использовании бактериальных культур и связанных с ними биохимических тестов, составляет от 48 часов до 5 суток. Их стоимость соответственно высока в связи с трудозатратами и возможными отзывами продуктов. Многообещающей альтернативой применяемым в настоящее время методикам является использование масс-спектрометрии MALDI-TOF в сочетании с селективными средами обогащения, которые ускоряют процесс анализа и снижают полную стоимость анализа.

## Анализ ультрапастеризованного молока

При использовании платформы iD<sup>plus</sup>™ можно достоверно определять очень низкие уровни внесенного патогена в широком диапазоне пищевых продуктов (ультрапастеризованное молоко, паштеты, дыни-кantalупы и сыр камабер). Опыты проводили, попеременно чередуя питательные среды BHI (бульон с сердечно-мозговым экстрактом) и OBL (новейшая среда обогащения для *Listeria* фирмы Oxoid Ltd) на смоделированной системе ультрапастеризованного молока. В первоначальных экспериментах удалось идентифицировать *Listeria monocytogenes* в пробах зараженного молока при конечной концентрации 1 КОЕ/мл, сочетая предварительное суточное обогащение на селективной среде OBL и последующее 6-часовое вторичное обогащение на неселективной среде BHI, как показано на Рисунке 2.

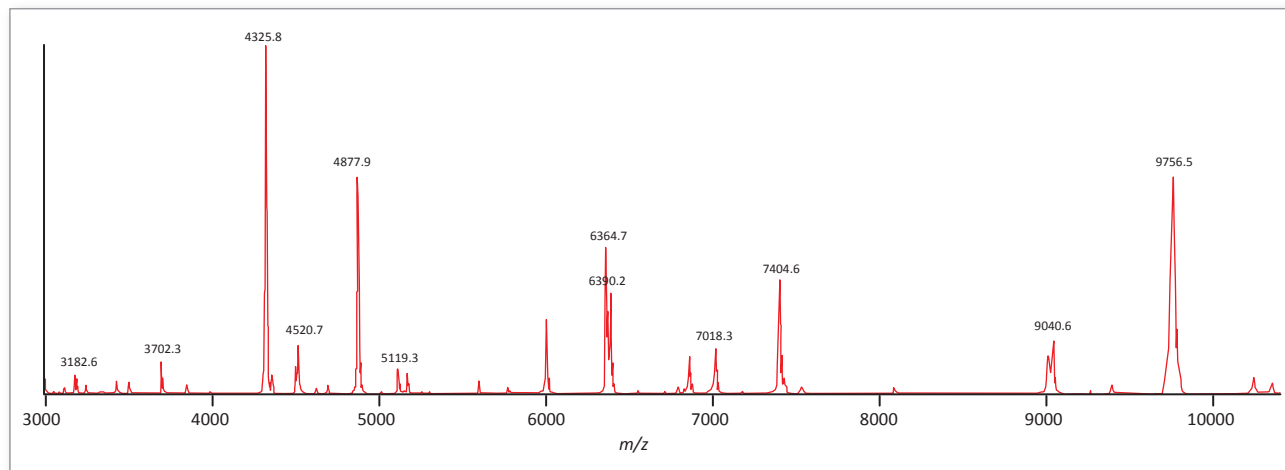


Рисунок 2: Профиль iD<sup>plus</sup> для *Listeria monocytogenes*, обогащенных из ультрапастеризованного молока первично в среде OBL и вторично в среде BHI

Однако в случае более сложных пищевых продуктов с собственной фоновой микробиотой, как, например, мягкий сыр, первоначальная инкубация в селективной среде OBL может оказаться недостаточной для полного удаления фоновых микроорганизмов, и таким образом может произойти повторное обогащение в процессе 6-часовой инкубации в неселективной среде BNI. Это может негативно сказаться на идентификации *Listeria monocytogenes*.

Для полного устранения этой проблемы были поставлены опыты с молоком, зараженным смесью трех бактерий (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* O157:H7) в соотношении 1:1:1. В этих опытах OBL использовалась и как первичная, и как вторичная среда. В этом случае оказалось возможным достоверно идентифицировать *Listeria monocytogenes* из смеси бактерий при уровне затравки 1 КОЕ/мл в среде.

## Анализ сложных пищевых продуктов

Подобные эксперименты были проведены и для более сложных пищевых проб: дыни-кantalупы, куриного паштета и сыра камамбер. В пробы, не содержащие *Listeria* (проверялось инкубацией в питательной среде), добавляли *Listeria monocytogenes* и подвергали их первичному (в течение 24 часов) и вторичному (в течение 6 часов) обогащению в питательной среде OBL с конечным содержанием посевного материала 1 и 10 КОЕ/мл. При использовании платформы iDplus *Listeria monocytogenes* была успешно обнаружена во всех пробах при уровне 10 КОЕ/мл. По-видимому, при более низком уровне затравки очень сложная фоновая микробиота, такая, как в сыре (многочисленные посевные и вторичные бактериальные и грибковые культуры) могут влиять на идентификацию, а дальнейшее исследование на различных промежуточных носителях может снизить нужный уровень затравки. В случае пробы кantalупы, имеющей более простую микробиоту, был достоверно достигнут уровень 1 КОЕ/мл. Результаты представлены в Таблице 1.

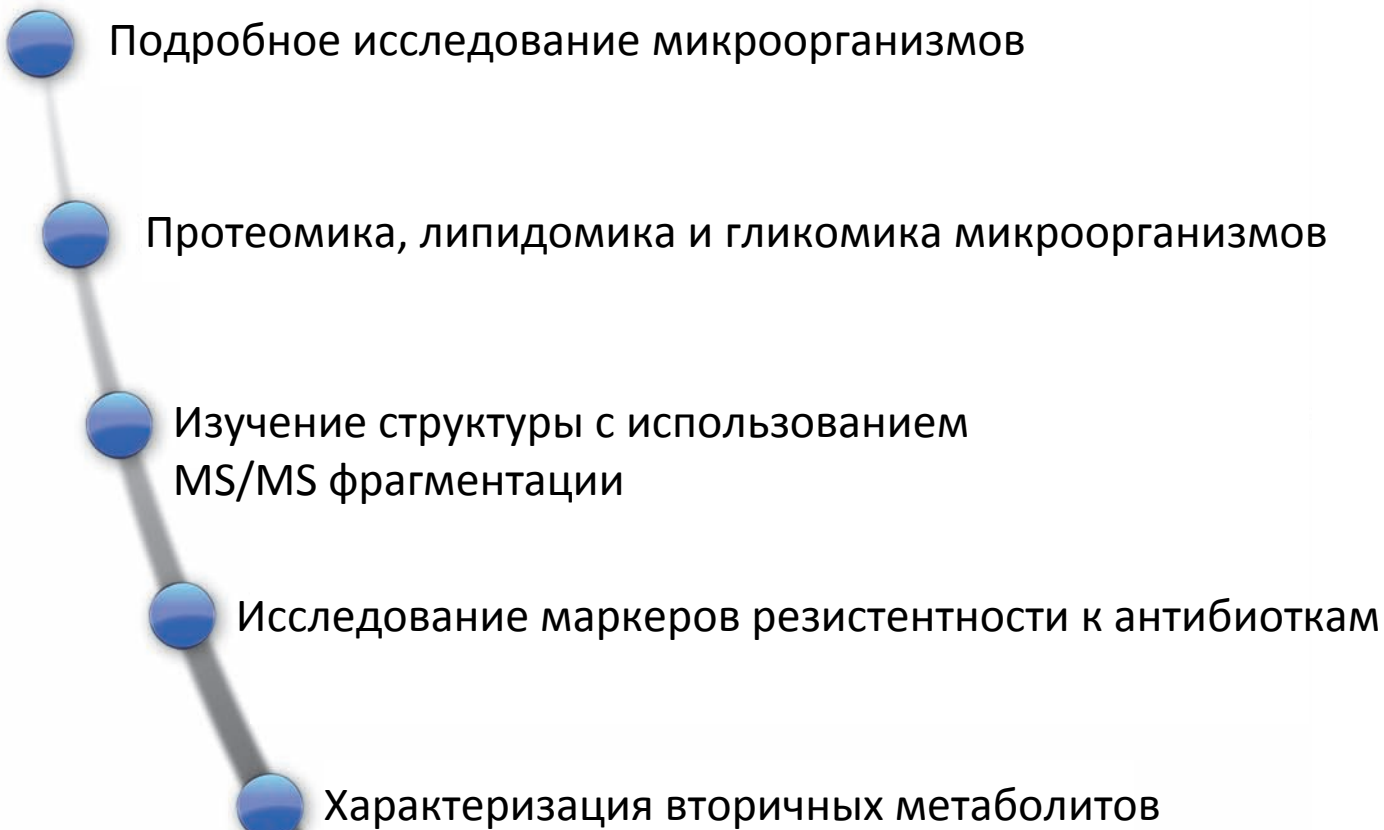
Таблица 1: Уровни затравки, необходимые для достоверного определения внесенной в пищевые продукты бактериальной культуры *Listeria monocytogenes* при помощи платформы iDplus в сочетании с двойным обогащением на питательной среде OBL.

Пищевой продукт	Использованные для внесения штаммы	Уровни затравки, достигнутые на MALDI-TOF MS
Ультрапастеризованное молоко	<i>Listeria monocytogenes</i> + <i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Escherichia coli</i> O157:H7	1 КОЕ/мл (для каждого)
Канталупа	<i>Listeria monocytogenes</i>	1 КОЕ/мл
Куриный паштет	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 КОЕ/мл
Сыр камамбер	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 КОЕ/мл

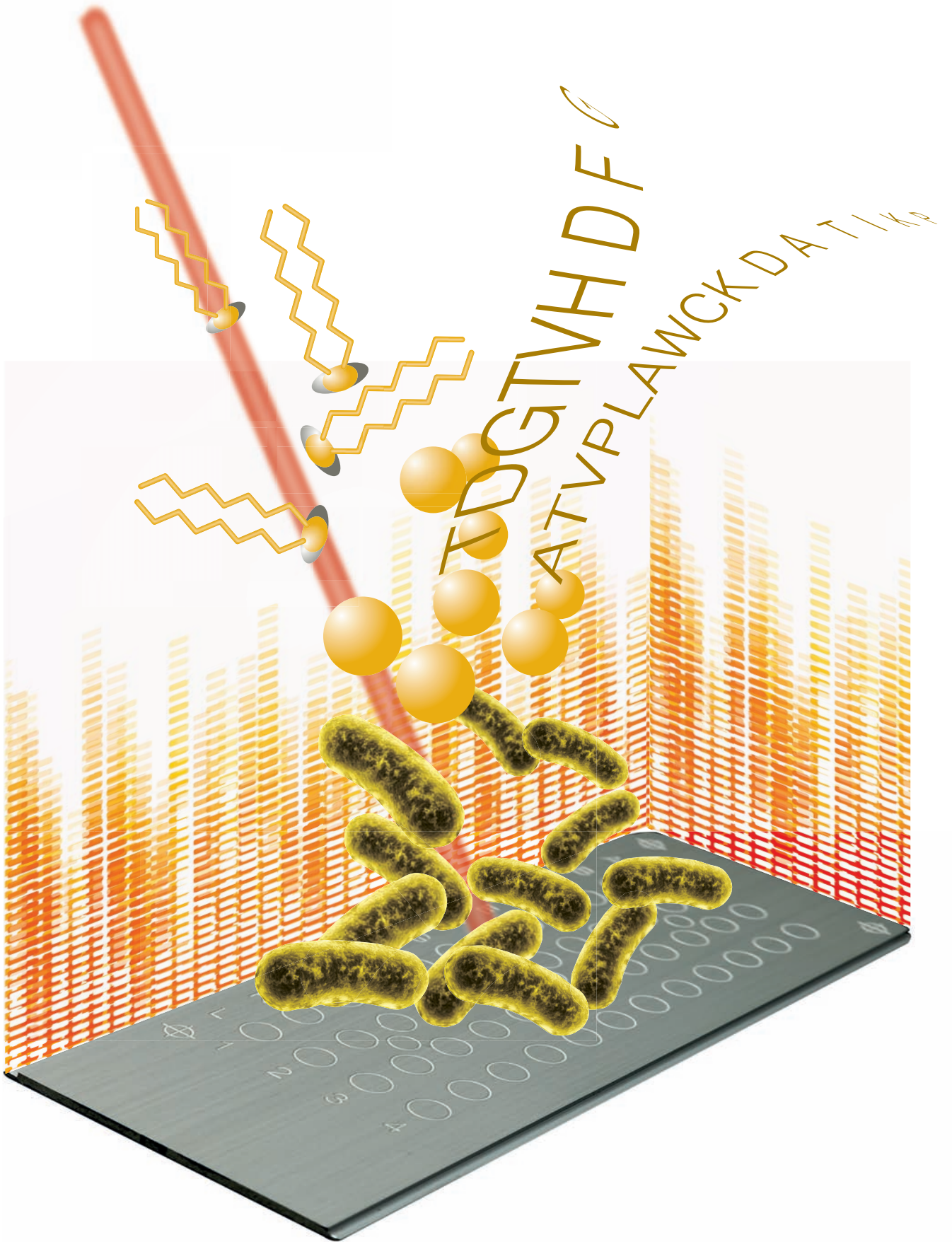
Эти результаты демонстрируют, что при помощи платформы iD<sup>plus</sup> можно быстро и надежно определять *Listeria monocytogenes* в сложных пищевых продуктах. При условии подбора правильной селективной питательной среды возможно применение данной технологии и для определения других микроорганизмов.

- Надежное определение *Listeria monocytogenes* в молоке и сложных продуктах питания
- Сокращенное время определения, по сравнению с применяемыми в пищевой промышленности биохимическими методами
- Технология применима и для определения других развивающихся в продуктах питания патогенов

## MS/MS в микробиологии

- 
- Подробное исследование микроорганизмов
  - Протеомика, липидомика и гликомика микроорганизмов
  - Изучение структуры с использованием MS/MS фрагментации
  - Исследование маркеров резистентности к антибиоткам
  - Характеризация вторичных метаболитов





Take Analysis Further™

# MS/MS в микробиологии

Времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из матрицы (MALDI-TOF MS) в последнее время привлекла внимание в качестве быстрой и простой технологии для идентификации бактерий и других микроорганизмов. Однако сейчас во многих случаях простой идентификации микроорганизма недостаточно, и возникает потребность в получении дополнительной информации, которую из тех же самых проб микроорганизмов можно получить при помощи MALDI-TOF MS/MS. MALDI-TOF MS/MS можно использовать для получения информации о структуре цельной молекулы исследуемого соединения благодаря возможности дополнительной фрагментации выбранного иона и анализа полученного масс-спектра дочерних ионов. MS/MS также позволяет определять интересующие вещества в сложных смесях благодаря специфическому характеру фрагментации последних

## Вторичные метаболиты

Вторичные метаболиты — это соединения с низкой молекулярной массой, которые продуцируются организмом, но не являются жизненно необходимыми для его существования. Для бактерий наиболее типичными из вторичных метаболитов являются небольшие молекулы антибиотиков. Как достоверно известно, один из подобных организмов, *Bacillus subtilis*, вырабатывает вторичный метаболит сурфактин, имеющий свойства антибиотика. Поскольку идентификация микроорганизмов с использованием MALDI-TOF MS обычно имеет дело с диапазоном масс от  $m/z$  2000 до  $m/z$  20 000, то для определения вторичных метаболитов с более низкой молекулярной массой данный диапазон неприменим. Несложные корректировки, внесенные в определяемый диапазон масс в процессе прямого микробиологического определения, а самое главное, использование режима рефлектрона и фрагментации MS/MS, позволяют системе iDplus эффективно определять соединения в диапазоне масс липидов, а также идентифицировать вторичные метаболиты.

Единичную колонию культивированной *Bacillus subtilis* смешивали с матрицей ЦГКК и наносили непосредственно на одноразовую подложку FlexiMass-DS™. Анализ пробы проводили в режиме положительной ионизации с использованием платформы iD<sup>plus</sup>, оснащенной рефлектроном и возможностью высокоэнергетической соударительной диссоциации (HE-CID) для анализа MS/MS. На Рисунке 3 показан масс-спектр, полученный для пробы *Bacillus subtilis* в диапазоне масс от  $m/z$  4000 до  $m/z$  15 000. Он был использован для правильной идентификации *Bacillus subtilis* по базе данных iD<sup>plus</sup>.

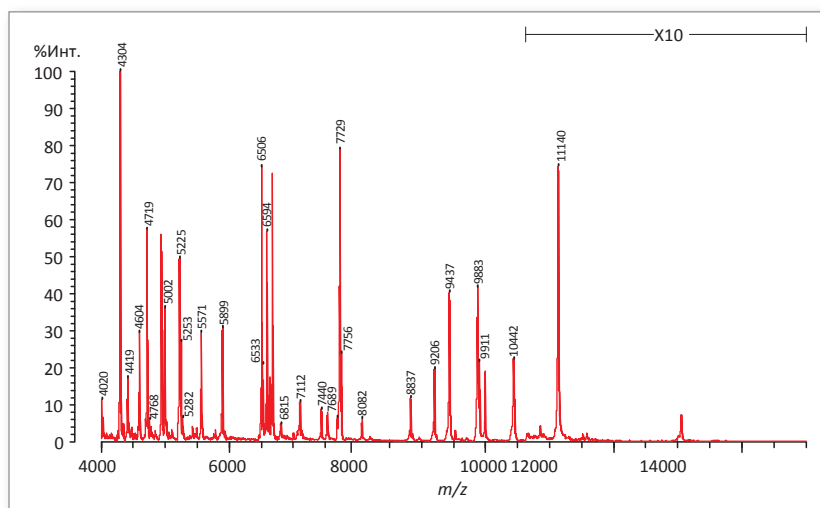


Рисунок 3: Спектр iD<sup>plus</sup> для *Bacillus subtilis*

Затем диапазон масс был изменен на  $m/z$  от 700 до 3000, что позволило детектировать пик с  $m/z$  1042 (Рисунок 4). Использование матрицы ЦГКК способствует детектированию пептидов, и было высказано предположение, что некоторые из пиков являются нерибосомальными пептидами, относящимися к классу вторичных метаболитов. После поиска пика с  $m/z$  1042 по бесплатной онлайн-базе данных по нерибосомальным пептидам Norgine, одним из возможных кандидатов был сочтен сурфактин, являющийся циклическим липопептидом с аминокислотной последовательностью Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu и липидным остатком ( $C_{15}H_{30}O_3$ ).

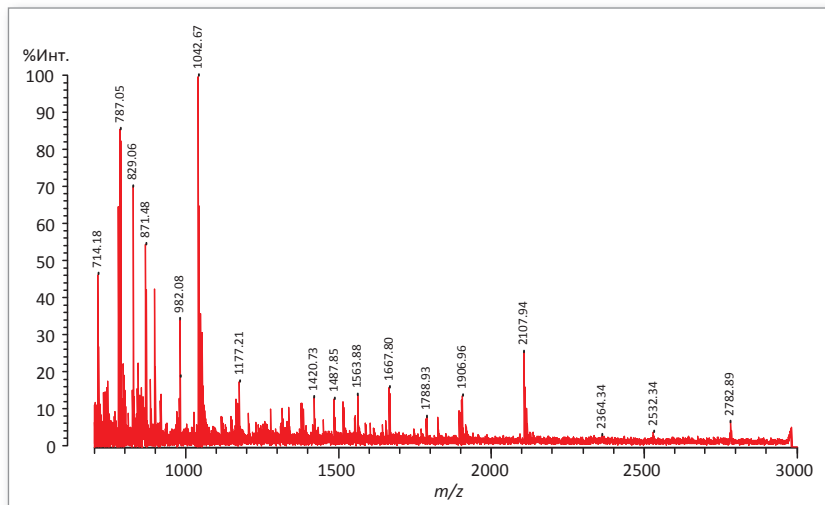


Рисунок 4: Определение вторичных метаболитов *Bacillus subtilis* с использованием *iD<sup>plus</sup>*

Для подтверждения идентификации путем определения первичной структуры был выбран ион с  $m/z$  1042 для фрагментации с последующим анализом спектра дочерних ионов. Была установлена первичная структура, и сурфактин был достоверно идентифицирован (Рисунок 5).

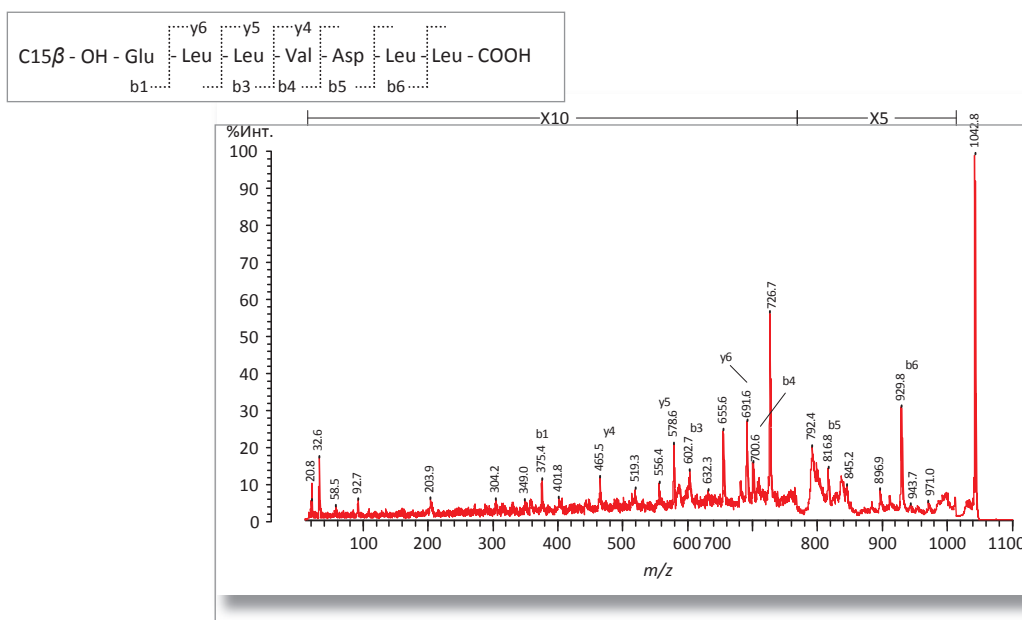


Рисунок 5: MS/MS вторичного метаболита *Bacillus subtilis* с  $m/z$  1042 при использовании *iD<sup>plus</sup>*

- Эффективное определение вторичных метаболитов непосредственно в культивируемых организмах
- Быстрая идентификация видов с использованием **ID** микроорганизма
- Структурная идентификация вторичных метаболитов с использованием MS/MS

# MS/MS в микробиологии

Большую озабоченность во всем мире вызывают мультирезистентные (MDR) энтеробактерии, вырабатывающие β-лактамазы расширенного спектра (ESBL) и карбапенемазы. ESBL проявляют резистентность к широкому спектру β-лактамных антибиотиков, которые в настоящее время используются для эмпирической терапии первой линии при лечении вызванных грам-отрицательными бактериальными инфекциями заболеваний, а присутствие карбапенемаз наподобие NDM и VIM значительно ограничивает возможности применения антибиотиков. Эти механизмы резистентности являются плазмид-опосредованными. Легкость, с которой эти плазмиды могут перемещаться между видами, делает раннее определение жизненно необходимым для быстрого назначения лечения и мероприятий по санитарно-эпидемиологическому режиму.

В настоящее время первичные ESBL в Великобритании (и одни из самых распространенных в мире) принадлежат к генотипу CTX-M 15, причем большинство из этих ESBL плазмид переносят комбинации, ответственные за перекрестную резистентность к комбинациям хинолонов, аминогликозидов и сульфамидов. Это явление наблюдается также для плазмид, переносящих β-лактамазы Amp-C и металло-β-лактамазы класса Ambler B.

## Маркеры резистентности лабораторных изолятов

Были приготовлены четыре лабораторных изолята на основе DH5 альфа *E. coli* с различными структурами плазмид pBAD (Таблица 2): изоляты 1 по 3 обладали β-лактамазной устойчивостью к антибиотикам, а изолят 4 был полностью чувствителен к антибиотикам.

Изолят	TEM1	CTX-M 15	KanR
1	✓	✗	✗
2	✓	✓	✓
3	✓	✗	✓
4	✗	✗	✗

Таблица 2: Сведения о лабораторных изолятах на предмет их механизма β-лактамазной устойчивости

После выращивания в аэробных условиях цельные бактериальные клетки были проэкстрагированы специальным образом, а белки восстановлены, алкилированы и расщеплены трипсином. Триптические пептиды перед анализом MALDI-TOF MS на платформе iD<sup>plus</sup> были выделены при помощи нано-ЖХ. Все анализы MALDI были полностью автоматизированы, а все MS/MS выполнялись с высокой (20 кэВ) энергией соударительной диссоциации. Для обработки данных был использован поисковик MASCOT™ по базе данных NCBI.

Пептидные биомаркеры энзимов, отвечающие за β-лактамазную устойчивость, были найдены в изолятах DH5 альфа *E. coli* 1, 2 и 3. Как и ожидалось, в чувствительном к антибиотикам изоляте 4 ни один из этих энзимов найден не был. На Рисунке 6 приведен пример результатов MS и MS/MS, полученных при идентификации изолята В методом ЖХ-MALDI. Массы, полученные в спектре MS/MS, были обработаны с помощью MASCOT, и был идентифицирован энзим, связанный с β-лактамазой типа CTX-M.

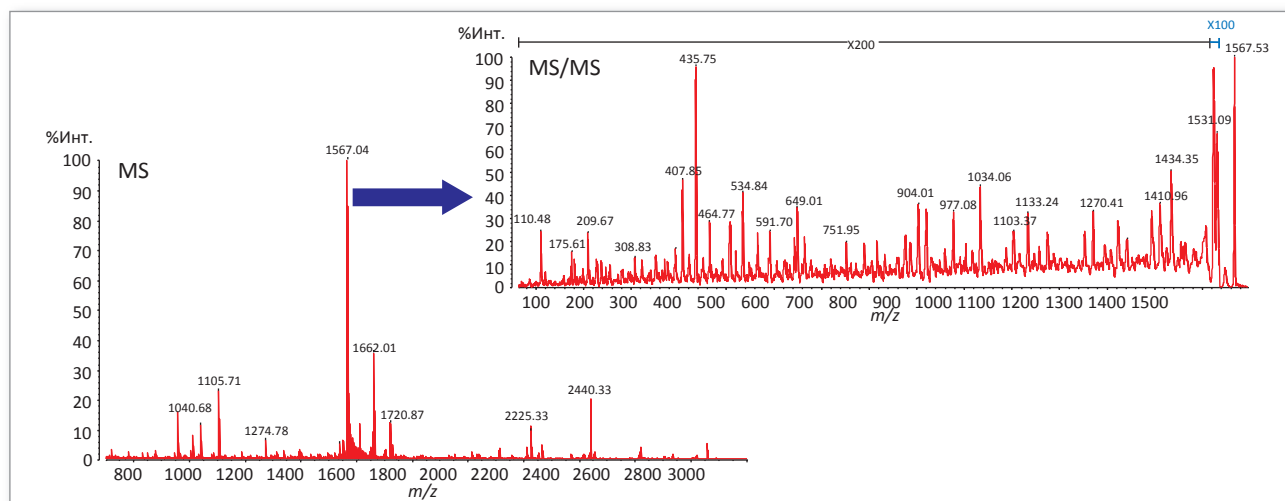


Рисунок 6: Спектры MS и MS/MS изолята 2, полученные методом ЖХ-MALDI

В таблице 3 приведены число идентифицированных биомаркеров и механизм резистентности (на основании идентифицированных энзимов) для каждого из лабораторных изолятов DH5 альфа *E. coli*. Обратите внимание: для изолята 4, полностью чувствительного к антибиотикам, не было определено ни одного биомаркера.

Резистентность	Число биомаркеров	Изолят
TEM1	5	1,2 и 3
CTX-M 15	14	2
KanR	6	2 и 3

Таблица 3: Механизм резистентности и число биомаркеров, определенных для каждого из лабораторных изолятов

Эти результаты показывают, что платформа *iD<sup>plus</sup>* способна различать микроорганизмы на уровне видов и уровне штаммов, при том, что единственным отличием в штаммах было наличие плазмид с измененной резистентностью к антибиотикам.

### Путь к идентификации маркеров резистентности в клинических изолятах

Дальнейшие опыты были проведены с использованием немодифицированных клинических изолятов. В этом случае оказалось возможным определять пептидные последовательности энзимов резистентности клинических штаммов, в которых наличествовали множественные механизмы резистентности. Некоторые из идентифицированных энзимов включали β-лактамазы класса Ambler C Amp-C и металло-β-лактамазы класса Ambler B. Все результаты ЖХ- MALDI были подтверждены и валидированы путем сравнения с результатами, полученными с использованием традиционных методов лабораторной диагностики. Последние включали стандартные методы автоматизированного лабораторного испытания на антибиотики (AST) и молекулярные методы, рутинно используемые в клинических микробиологических лабораториях. Кроме того, также было проанализировано и использовано как контроль некоторое количество сенситивных (нерезистентных) бактериальных изолятов, с целью демонстрации отсутствия энзимов резистентности.



Используемый для пробоподготовки наноспоттер Shimadzu LC-Accuspot™

- Возможность определения маркеров резистентности в идентичных и неидентичных бактериальных штаммах
- Различение штаммов, основанное на генотипе и фенотипе по отношению к антибиотикам
- Очевидно, что ЖХ-MALDI предлагает новые и перспективные возможности для исследования механизмов резистентности и возможно, в конечном счете, клинического применения MALDI для тестирования на устойчивость к антибиотикам

# Молекулярный профайлинг



A word cloud of scientific and analytical terms arranged in a network structure. The words are connected by thin grey lines to a central grey sphere, with other grey spheres branching out to the left and right. Three orange spheres are positioned at the top right of the network. The words are in various orientations and colors (black, red, and grey).

flexibility adulteration foodstuff  
CLASSIFICATION analysis database open  
AUTHENTICITY dendrogram platform population  
identification TAXON-SPECIFIC distinguishable  
discrimination provenance difference hierarchy  
wide molecular cluster characterization customizable detection variety species  
cluster variety hierarchy samples  
PROFILES effective RELIABLE

# Молекулярный профайлинг

## Фальсификация продуктов в молочной промышленности

Фальсификация молочных продуктов — важная проблема пищевой промышленности. Методы определения незаконного добавления коровьего молока к более дорогим молоку и молочным продуктам очень важны для искоренения вызванной алчностью фальсификации продуктов. Европейское законодательство по защите источника происхождения (PDO) охраняет популярный сыр моцарелла из буйволиного молока, производимый в итальянской области Кампания (Mozzarella di Bufala Campana). Если моцарелла изготовлена из коровьего молока, она не получит сертификат PDO, и соответственно будет стоить значительно дешевле. Это и приводит к постоянным попыткам выдать моцареллу из коровьего молока за моцареллу из буйволиного, и когда в 2010 году итальянское министерство сельского хозяйства провело проверку Mozzarella di Bufala Campana, то оказалось, что по меньшей мере 25% проб содержат коровье молоко.

## Открытая настраиваемая база данных

Гибкость открытой базы данных iD<sup>plus</sup>, позволяет использовать платформу для опытов по молекулярному профайлингу и различению сходных образцов на основе уникальных особенностей их молекулярного профиля. Для создания подструктур базы данных в специфической области исследования можно создавать новые, уникальные, специфичные для пробы SuperSpectra. Как сообщалось, это применимо для таких разных областей, как энтомология, исследование зоопланктона и эукариотических клеток, видообразование рыб и изучение развивающихся на продуктах питания бактерий (ссылки 1-7). Молекулярный профайлинг оказался, кроме того, и эффективной технологией для анализа фальсифицированных пищевых продуктов. Из нескольких источников (Таблица 4) были получены два типа сыра моцарелла (из коровьего и буйволиного молока). Для каждого образца моцареллы были получены многочисленные референсные спектры, и в совокупности с характеристическими SuperSpectra на их основе была составлена база данных по молочным продуктам. Небольшое количество моцареллы бактериологической петлей наносили непосредственно на мишень FlexiMass-DS, а затем добавляли 1 мкл матрицы ЦГКК. Спектры были получены в диапазоне от  $m/z$  2000 до  $m/z$  20 000.

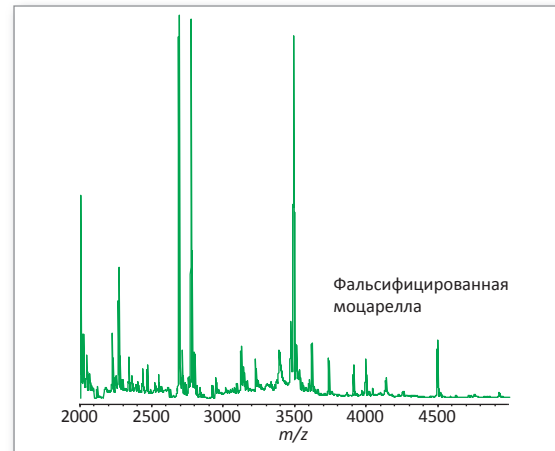
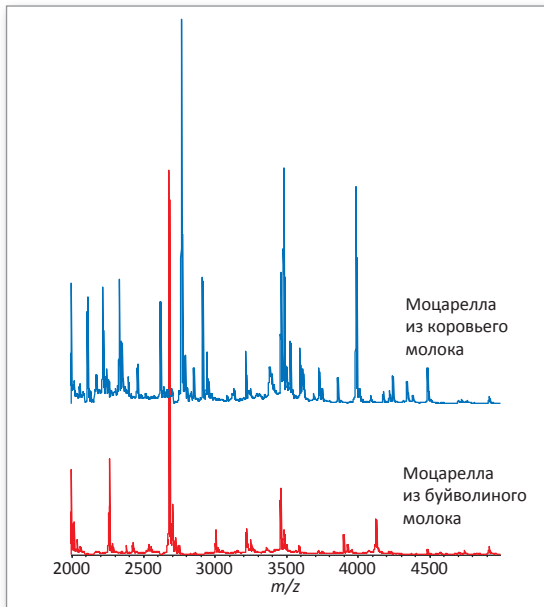
Наименование продукта	Тип продукта	Биологический вид
Galbani	Моцарелла	Корова
Waitrose Italian	Моцарелла	Корова
Cantile	Моцарелла	Буйвол
Laverstock Park	Моцарелла	Буйвол
Garofalo	Моцарелла	Буйвол

Таблица 4: Сведения о пробах моцареллы

## Молекулярные профили, высокоспецифичные для различных объектов

Из разных типов моцареллы были получены различимые молекулярные профили со многими специфичными для данного типа массами. На Рисунке 7 ясно видны различия, наблюдаемые между моцареллой из коровьего и буйволиного молока. Для имитации фальсификации пробы моцареллы к сыру Mozzarella di Bufala Campana была добавлена моцарелла из коровьего молока, и проба приготавливалась ранее описанным способом. На Рисунке 7 также приведен и молекулярный профиль фальсифицированной пробы, и на нем ясно видны масс-пики, характерные для обоих. При поиске результата для фальсифицированного образца по специфичной базе молочных продуктов фальсификация была недвусмысленно установлена (на Рисунке 8 этот результат отмечен красным цветом). При более подробном просмотре видно, что образец соответствует SuperSpectra базы данных для моцареллы как из коровьего, так и из буйволиного молока, однозначно выявляя фальсифицированный образец.





Identified As	For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.	sample	%	family
24 Apr 2014 13:56	L_NonSpec_mozz_0001_2D3[1]	99.90	Cow	
24 Apr 2014 13:56	L_NonSpec_mozz_0001_2D3[1]	99.90	Buffalo	
24 Apr 2014 14:02	L_buffalo_and_cow_mozz_mozz_0001_2D3[1]	99.90	Cow	
24 Apr 2014 14:02	L_buffalo_and_cow_mozz_mozz_0001_2D3[1]	99.90	Cow	
24 Apr 2014 14:02	L_buffalo_and_cow_mozz_mozz_0001_2D3[1]	99.90	Cow	
24 Apr 2014 13:57	L_NonSpec_mozz_0001_2D3[1]	99.90	Cow	
24 Apr 2014 13:57	L_NonSpec_mozz_0001_2D3[1]	99.90	Cow	

SARAMS Identify Details		For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.		
buffalo_and_w_nonSpec_mozz2_0001_2D3[1]				
identification	Points	%	sort	family
superprotein_Mozzarella	1147	99.90	1	Cow
superprotein_Buffalo_Mozzarella	805	80.50	2	Buffalo

Рисунок 7: Молекулярные профили для моцареллы из коровьего и буйволиного молока, а также фальсифицированной моцареллы, полученные с помощью iD<sup>plus</sup> и базы данных. Подтверждается наличие фальсификации

## Определение фальсификации

Было проведено дальнейшее исследование фальсифицированных образцов. Кластерный анализ результатов ясно выявляет три различающиеся группы: моцарелла из буйволиного молока, моцарелла из коровьего молока и фальсифицированная моцарелла (смесь из коровьего и буйволиного молока). Это подтверждает, что систему iD<sup>plus</sup> можно применять для определения фальсификации молочных продуктов (Рисунок 8).

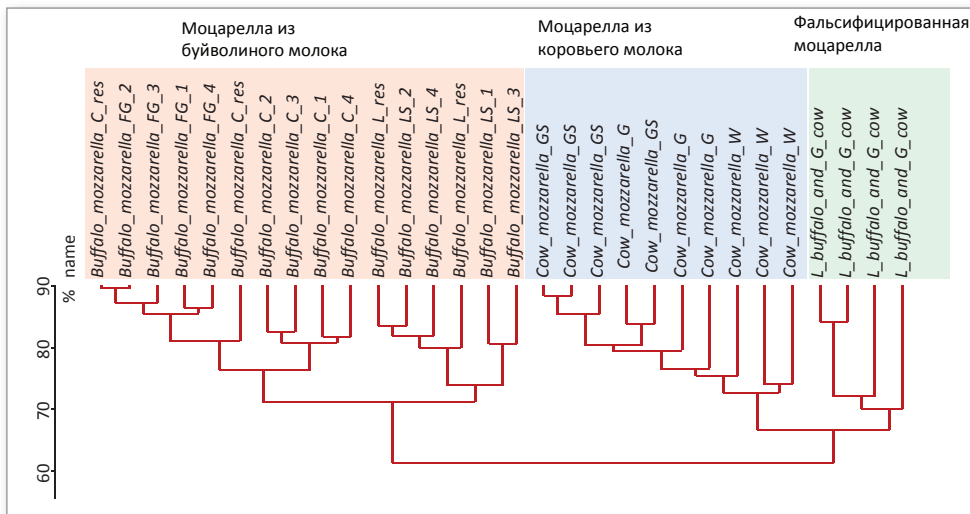


Рисунок 8: Кластерный анализ моцареллы из буйволиного молока, моцареллы из коровьего молока и фальсифицированной моцареллы

- Эффективная дифференциация сыра моцарелла, изготовленного из различных типов молока
- Простое, быстрое и надежное определение фальсифицированных продуктов
- Применимо для широкого спектра пищевых продуктов

# Молекулярный профайлинг

Клеточные линии очень важны в качестве среды для вакцин, рекомбинантных белков и моноклональных антител. Несмотря на их широкое использование, большой проблемой в биологических исследованиях остаются перекрестная контаминация и неверное определение клеточных линий. На практике установлено, что до 20% используемых в настоящее время клеточных линий загрязнены другими агентами, такими, как бактерии, вирусы или другие клетки. Современные методы удостоверения подлинности клеточных линий включают двумерный гель-электрофорез, кариотипирование, короткую tandemную дупликацию (STR) и полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), однако эти методы трудоемки и дорогостоящи. Привлекательной альтернативой является молекулярное профилирование с использованием MALDI-TOF MS.

## Простая пробоподготовка

Пробоподготовка для удостоверения подлинности клеточных линий с использованием *iD<sup>plus</sup>* является простой и быстрой (Рисунок 9). Около 1 мкл клеток из конгломерата клеток, полученного из отмытой фосфатно-солевым буфером культуры, экстрагировали 10% муравьиной кислотой (20 мкл) и смешивали с матрицей из синапиновой кислоты (40 мкл). Для анализа на *iD<sup>plus</sup>* отбирали 1 мкл полученного раствора и наносили на мишень. Полученные из результирующего масс-спектра списки пиков для идентификации вносили в базу данных *iD<sup>plus</sup>*.



Рисунок 9: Процесс пробоподготовки

## Настраиваемая база данных клеточных линий

Используя возможности открытой базы данных *iD<sup>plus</sup>*, были созданы специфические молекулярные профили для 11 видов клеточных линий. С использованием базы данных *iD<sup>plus</sup>* на основе многочисленных библиотечных спектров и таксон-специфичного алгоритма, использующего весовые коэффициенты, были установлены валидированные молекулярные профили (SuperSpectra) для каждого из таксонов. Анализ был выполнен для 146 разных клеточных линий эукариотов 11 разных видов (Рисунок 10).

На основании составленной базы данных были проанализированы еще 418 клеточных линий (178 от млекопитающих и 240 от насекомых), полученных из различных источников. В результате установлено, что с использованием системы *iD<sup>plus</sup>* и составленной базы данных 412 (98,5%) этих клеточных линий были идентифицированы достоверно. Что касается шести недостоверно определенных проб, то в двух из них состав по массам оказался существенно изменен, возможно, ввиду загрязнения образца, в двух профиль масс оказался неизвестным, а два оставшиеся были идентифицированы как другие виды.

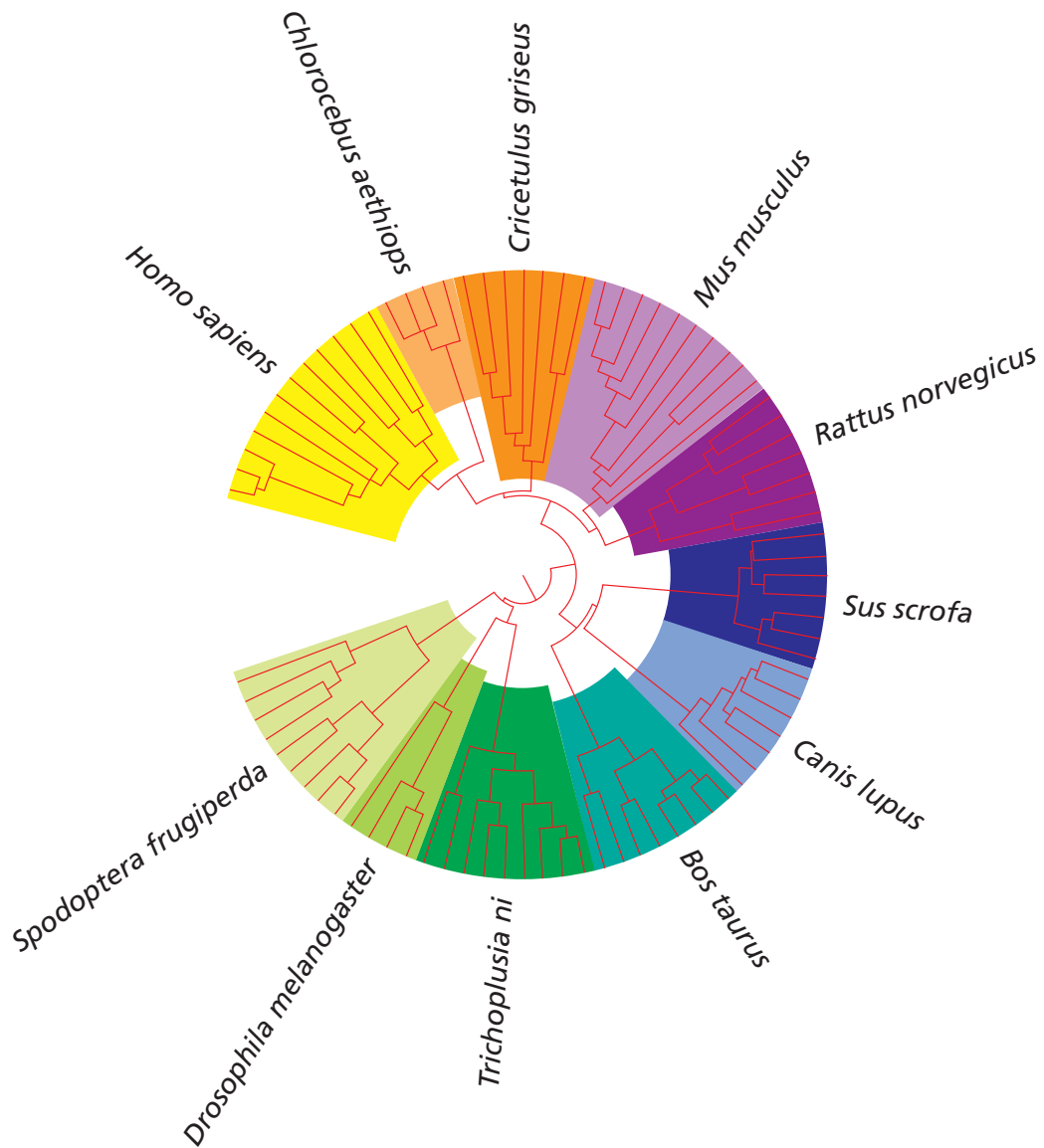


Рисунок 10: Кластерный анализ различных клеточных линий эукариотов

- Быстрый, точный и высокопроизводительный метод для распознавания перекрестного загрязнения клеточных линий
- Простое построение специфичных для пробы библиотек профилей
- *iD<sup>plus</sup>* обеспечивает простую и эффективную альтернативу традиционному методу подтверждения идентичности клеточных линий в биотехнологии

Источник: Vogel G et al. BMC Proc. 2011; 5(приложение 8):C.45

# Кластерный анализ



Идентификация эпидемий



Описание новых видов



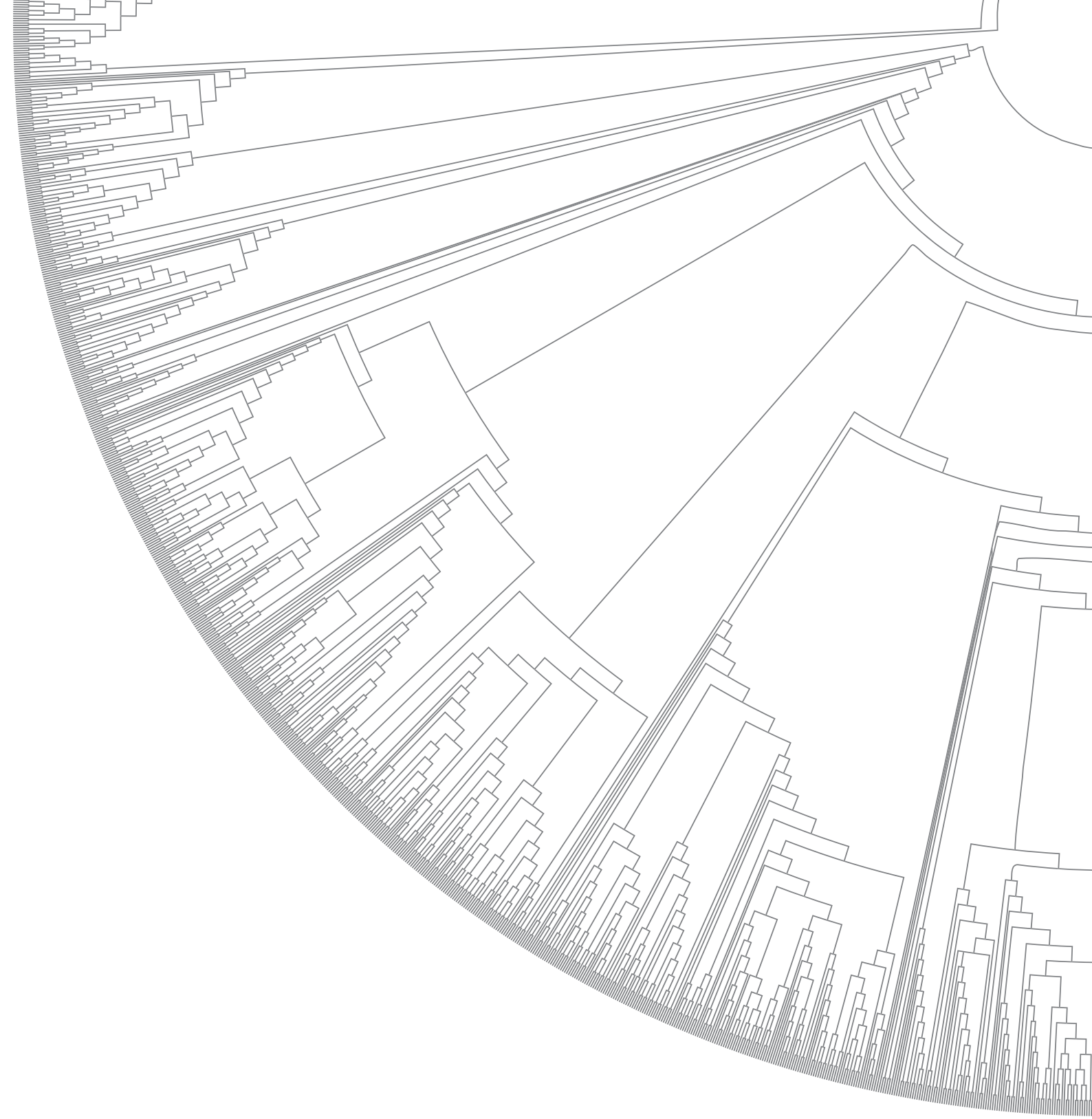
Обнаружение типоспецифичных биомаркеров



Раннее определение потенциального режима лечения



Исследование таксономии



# Кластерный анализ

Грам-отрицательная бактерия *Yersinia enterocolitica* считается важным патогеном в заболеваниях, связанных с пищевыми продуктами. Идентификация штаммов *Yersinia enterocolitica* внутри рода *Yersinia*, а также различение патогенных и непатогенных биотипов очень важны для предотвращения, диагностики и контроля заболеваний. Идентификация видов *Yersinia enterocolitica* обычно возможна как комбинация биохимических и серотипических методов, однако идентификация и различение с их помощью является время- и трудозатратной, а также потенциально недостоверной.

Платформа iD<sup>plus</sup> является привлекательной альтернативой для идентификации и субтипирования штаммов *Yersinia enterocolitica*.

## SuperSpectra, специфичные по штаммам и биотипам

Сначала была создана библиотека референсных масс-спектров для штаммов *Yersinia* strains, происходящих от человека, продуктов питания и окружающей среды. В четырех параллельных исследованиях были проанализированы девятнадцать штаммов *Yersinia enterocolitica* (содержащих явно различные биотипы) и 24 других штамма *Yersinia* ssp, покрывающих 12 видов (приведены в Таблице 5), и на их основе была создана специфичная для *Yersinia* база данных, содержащая комбинацию точно определенных SuperSpectra и референсных спектров.

Виды <i>Yersinia</i>		
<i>Y. enterocolitica</i> biotype 1A	<i>Y. bercovieri</i>	<i>Y. frederiksenii</i>
<i>Y. enterocolitica</i> biotype 2/O5,27	<i>Y. mollaretii</i>	<i>Y. intermedia</i>
<i>Y. enterocolitica</i> biotype 2/O9	<i>Y. similis</i>	<i>Y. rhodei</i>
<i>Y. enterocolitica</i> biotype 4/O3	<i>Y. aleksiciae</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
<i>Y. kristensenii</i>	<i>Y. aldovae</i>	<i>Y. ruckeri</i>

Таблица 5: Референсные виды, использованные при создании специфичной по *Yersinia* базы данных для iD<sup>plus</sup>

Для определения рода и вида *Yersinia* были выбраны 15 родоспецифичных и от 22 до 38 видоспецифичных масс с целью создания взвешенных SuperSpectra. Для идентификации биотипа и для создания точного списка масс биотипов из области "отпечатков пальцев" биотипа были удалены массы, специфичные для рода, специфичные для *enterocolitica*, и нехарактерные. Для создания SuperSpectra биотипа были выбраны двенадцать масс для каждого биотипа (1A, 2 и 4). На Рисунке 11 показаны профили масс для различных биотипов 1A, 2 и 4 (обратите внимание, что биотип 1A подразделяется на два: 1Aa и 1Ab).

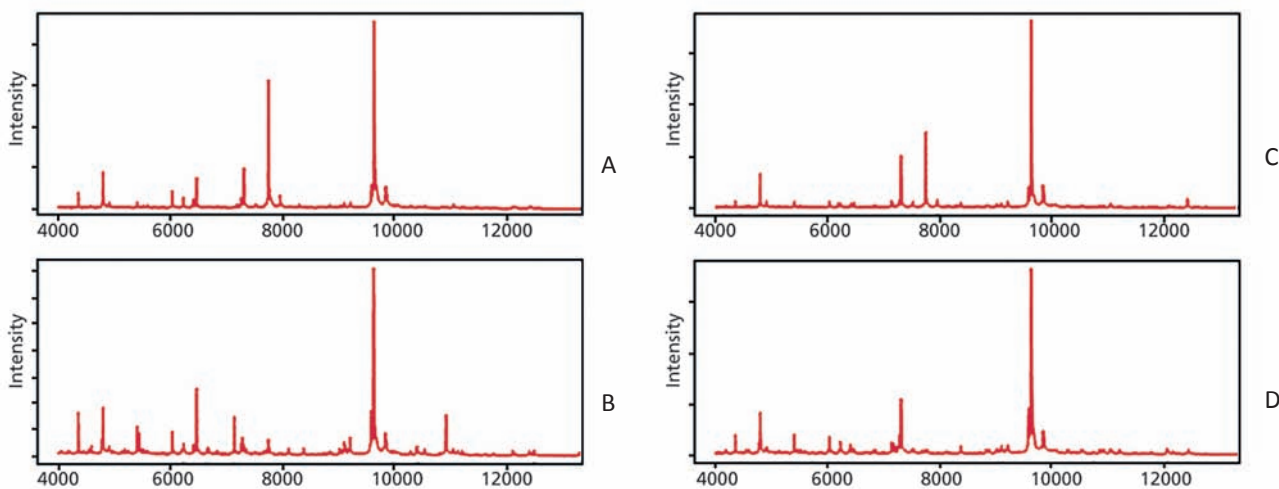


Рисунок 11: Типичные спектры *Yersinia enterocolitica*: Биотип 1A (спектр A = 1Aa и спектр B = 1Ab); биотип 2 (спектр C) и биотип 4 (спектр D)

## Субтипирование с использованием iD<sup>plus</sup>

Идентификация биотипа *Yersinia enterocolitica* была достигнута за две стадии. Сначала неизвестные пробы сравнивали с базой видов *Yersinia* для подтверждения того, что они действительно относятся к виду *Yersinia enterocolitica*. Затем пробы сравнивали со специфическими маркерами биотипа для определения биотипа *Yersinia enterocolitica*. Для достоверной идентификации биотипа потребовалось минимум 10-12 специфических маркеров биотипа.

Для проверки созданной базы данных и валидирования метода идентификации слепым исследованием были использованы 117 изолятов *Yersinia enterocolitica* четырех различных биотипов: 49 *Yersinia enterocolitica* биотипа 1А; 2 *Yersinia enterocolitica* биотипа 2/05, 27; 19 *Yersinia enterocolitica* биотипа 2/09 и 47 *Yersinia enterocolitica* биотипа 4/03.

Кластерный анализ этих результатов, соединенный с данными, использованными для создания SuperSpectra, показан на Рисунке 12 в виде древовидной диаграммы. С использованием платформы iD<sup>plus</sup> все штаммы и биотипы были достоверно идентифицированы, и результаты точно коррелируют с результатами биохимических методов характеристики биотипа.

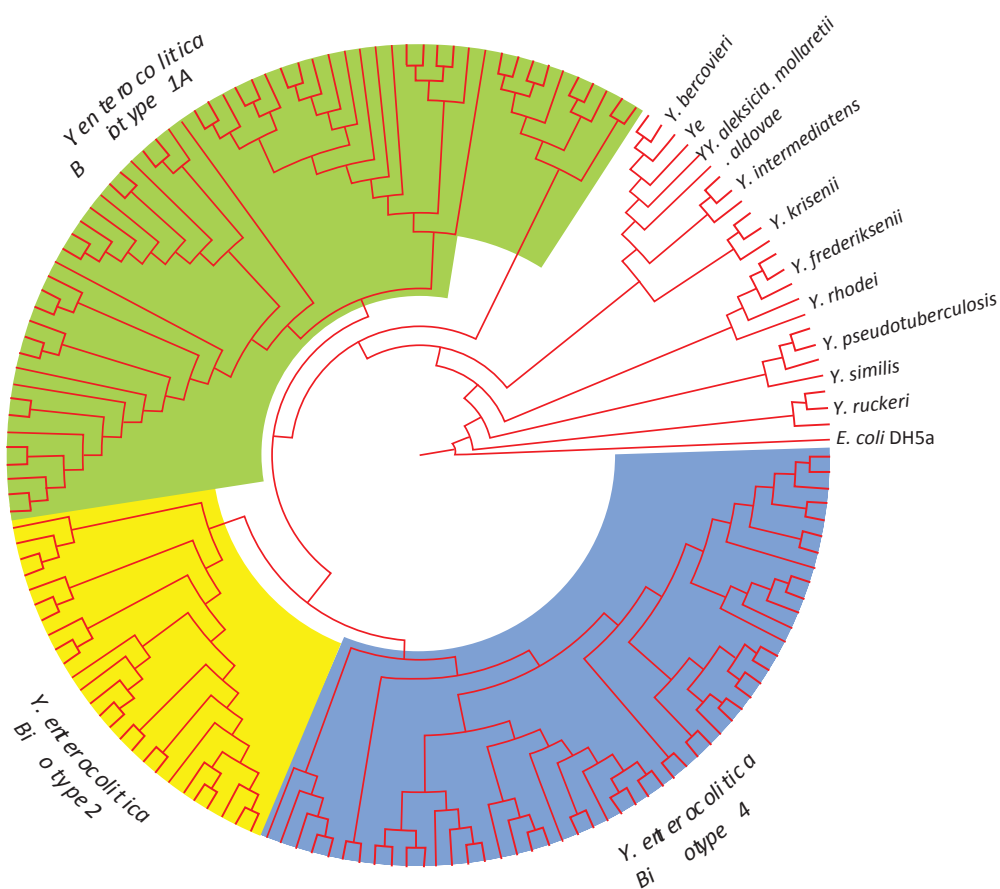


Рисунок 12: Кластерный анализ масс-спектров iD<sup>plus</sup>, полученных для штаммов *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia* ssp

- Мощный инструмент для идентификации видов *Yersinia enterocolitica*
- Субтипирование штаммов до уровня биотипа с использованием открытой базы данных и метода SuperSpectrum
- Высокая степень автоматизации для высокоэффективного анализа

# Кластерный анализ

Патогены *Candida* занимают четвертое место среди главных причин больничных инфекций в палатах интенсивной терапии. Хотя самой распространенной из них является *Candida albicans*, сообщалось и о таких видах *Candida*, как *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*, а также были идентифицированы вновь выявленные патогенные виды. Чрезвычайно важна быстрая идентификация видов дрожжевых инфекций, поскольку их чувствительность к противогрибковым препаратам значительно изменяется от вида к виду.

## Вновь выявленные патогенные виды *Candida*

Во многих случаях вновь выявленные патогенные виды *Candida* имеют сходство с более обычными описанными видами, что делает необходимость быстрой и простой идентификации дрожжей *Candida* еще более насущной. В Таблице 6 приведены сведения о видах *Candida*, рассмотренных в данном исследовании, а также сведения о их подоби.

Виды <i>Candida</i>	Распространенность в качестве больничных инфекций	Имеют сходство с...	Число проанализированных изолятов
<i>C. albicans</i>	самый обычный	-	20
<i>C. bracarensis</i>	вновь выявленный	<i>C. glabrata</i>	5
<i>C. glabrata</i>	обычный	<i>C. bracarensis</i>	6
<i>C. krusei</i>	обычный	-	5
<i>C. parapsilosis</i>	обычный	<i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i>	14
<i>C. tropicalis</i>	обычный	-	7
<i>C. orthopsilosis</i>	вновь выявленный	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i>	5
<i>C. metapsilosis</i>	вновь выявленный	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i>	2

Таблица 6: Сведения об изученных видах *Candida* и взаимосвязи между ними

При помощи платформы iD<sup>plus</sup> были проанализированы различные клинические изоляты *Candida*. Кроме них в качестве контрольных образцов метода в исследование были включены два изолята *Lodderomyces elongisporus* и четыре изолята *Saccharomyces cerevisiae*. *Lodderomyces elongisporus* рассматривались как телеоморфы *C. parapsilosis* ввиду их фенотипического подобия и зарегистрированных случаев их ложного определения в кровотоке как *C. parapsilosis*. Для обеспечения оценки надежности платформы iD<sup>plus</sup> каждый из исследованных образцов видов был предварительно идентифицирован с использованием сочетания идентификационных карт (Biomerieux, France) и методов секвенирования рекомбинантной ДНК 26S и внутреннего транскрибирующегося спейсера.

## Отличительные особенности в масс-спектрах

Был проведен масс-спектрометрический анализ каждого образца, помещенного непосредственно на мишень FlexiMass-DS и перед добавлением матрицы обработанной муравьиной кислотой. Полученные профили масс для *Candida* и контрольных видов оказались сходными, но специфичными. Полный анализ осуществлялся в широком диапазоне масс ( $m/z$  от 2000 до 20000), однако наибольшие различия наблюдались в диапазоне  $m/z$  от 5000 до 8000. В пределах этого диапазона масс каждая проба *Candida* имеет некоторое количество видозависимых сигналов массы, что позволяет проводить точное различение с использованием SuperSpectra.



## Кластерный анализ клинических изолятов *Candida*

Результаты, полученные для всех клинических изолятов и контрольных образцов, подвергли кластерному анализу. Масс спектры, полученные в процессе анализа методом MALDI-TOF MS, позволили достоверно отнести все изоляты с корреляцией 100% к определенным другими методами соответствующим им биологическим видам (Рисунок 13).

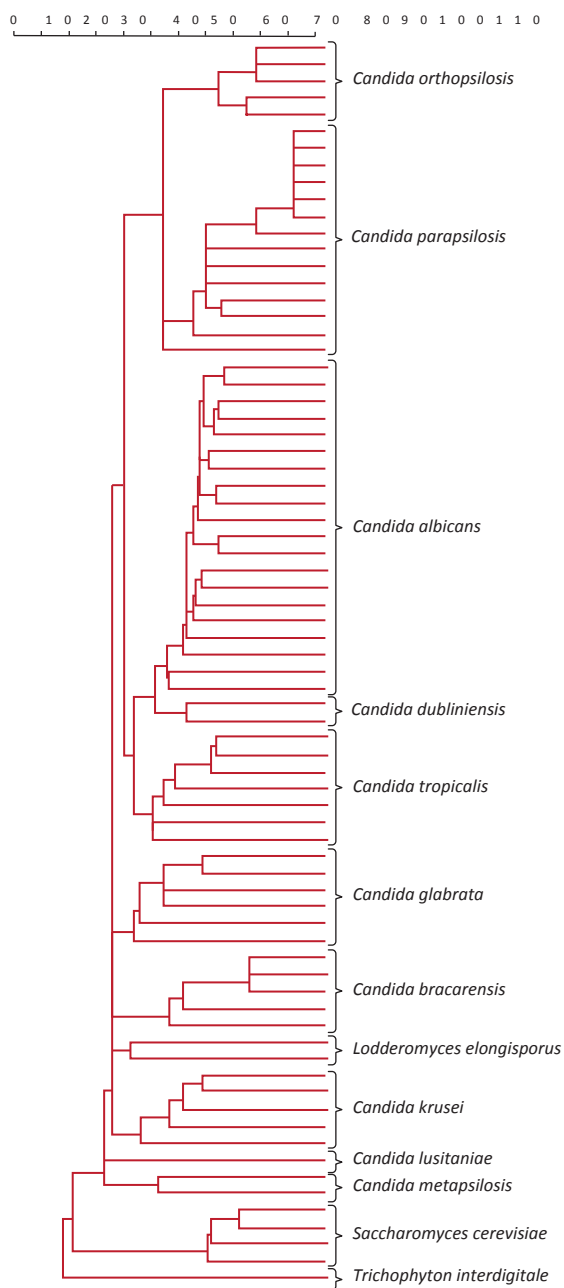


Рисунок 13: Кластерный анализ изолятов *Candida* и контрольных образцов

- Достоверная идентификация близкородственных видов *Candida*
- Быстрая идентификация вновь выявленных патогенных видов дрожжей
- Исключительно высокая корреляция с другими биохимическими методами, медленными и более дорогостоящими

# Использованная литература

- (1) Jadhav S, Seviour D, Bhawe M, Palombo EA. Detection of *Listeria monocytogenes* from selective enrichment broth using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J Proteomics*. 2014 Jan 31; **97**: 100-106.
- (2) Wey E, Hart P, Vanstone G, Openshaw M, Hopkins K, Woodford N, Belgacem O, McHigh T, Balakrishnan I. Detection of  $\beta$ -lactamase, aminoglycoside-modifying enzyme and carbapenemase resistance biomarkers directly using MALDI-TOF Tandem MS. ECCMID 2014.
- (3) Vogel G, Strauss A, Jenni B, Ziegler D, Dumermuth E, Antz S, Bardouille C, Wipf B, Miscenic C, Schmid G, Pflüger V. Development and validation of a protocol for cell line identification by MALDI-TOF MS. *BMC Proc*. 2011; **5**(Suppl 8): P45.
- (4) Müller P, Pflüger V, Wittwer M, Ziegler D, Chandre F, Simard F, Lengeler C. Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein profiling. *PLoS ONE*. 2013; **8**(2): e57486.
- (5) Kaufmann C, Schaffner F, Ziegler D, Pflüger V, Mathis A. Identification of field-caught *Culicoides* biting midges using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasitology*. 2012; **139**: 248-258.
- (6) Kaufmann C, Ziegler D, Schaffner F, Carpenter S, Pflüger V, Mathis A. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. *Medical and Veterinary Entomology*. 2011; **25**: 32-38.
- (7) Riccardi N, Lucini L, Bengali C, Welker M, Wicht B, Tonolla M. Potential of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification of freshwater zooplankton: a pilot study with three *Eudiaptomus* (Copepoda: Diaptomidae) species. *Journal of Plankton Research*. 2012; **34**: 6, 484-492.
- (8) Volta P, Riccardi N, Lauceri R, Tonolla M. Discrimination of freshwater fish species by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS): a pilot study. *J. Limnol*. 2012; **71**(1): 164-169.
- (9) Stephan R, Cernela N, Ziegler D, Pflüger V, Tonolla M, Ravasi D, Fredriksson-Ahomaa M, Hächler H. Rapid species specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*. 2011; **87**: 150-153.
- (10) Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011; **71**: 304-308.

# Выражение признательности

Компания Shimadzu выражает глубокую благодарность большому числу пользователей выпускаемой ею платформы iD<sup>plus</sup> за разрешение включить некоторые из полученных ими результатов исследований в данную брошюру.

В частности, мы благодарим профессора Enzo Palombo (Environment and Biology Centre, Swinburne University of Technology, Australia); доктора Emmanuel Wey (Royal Free Hospital, NHS Foundation Trust, UK); доктора Guido Vogel (Mabritec AG, Switzerland); профессора Roger Stephan (Institute of Food Safety and Hygiene, University of Zurich, Switzerland) и профессора Célia Pais (Centre of Molecular and Environmental Biology, University of Minho, Portugal).

# Линейка платформ *iD<sup>plus</sup>*



## *iD<sup>plus</sup>* Assurance Линейный MALDI-TOF

Система для простой идентификации микроорганизмов с использованием SARAMIS™ и базовых биологических исследований с использованием LaunchPad™. Соединяя в себе скорость анализа с ионизацией в положительных и отрицательных ионах, *iD<sup>plus</sup>* Assurance обеспечивает превосходное качество и надежность в основных настройках анализа.

## *iD<sup>plus</sup>* Confidence MALDI-TOF с рефлектроном

Патентованный рефлекτροн с изогнутым полем, установленный в *iD<sup>plus</sup>* Confidence, расширяет возможности анализа за пределы простой идентификации. Расширяя возможности идентификации микроорганизмов, режим рефлекτροна обеспечивает высокое разрешение и высокую точность масс, необходимые для молекулярного профайлинга и структурного анализа.



## *iD<sup>plus</sup>* Performance MALDI TOF-TOF

В этом надежном и точном приборе исследовательского класса объединены гибкость и простота использования. В режиме улучшенного MS/MS используется самая высокая энергия соударений для фрагментации веществ с целью структурного анализа.

Эта самая гибкая платформа *iD<sup>plus</sup>* пригодна для исследований от простой идентификации до самых углубленных протеомики, липидомики и секвенирования.





Основанная в 1875 году Корпорация Шимадзу занимает лидирующие позиции в разработке передовых технологий. Богатая история инновационных достижений базируется на основе широкого проникновения в общество научных разработок и технологий компании. Мы основали и поддерживаем глобальную мировую сеть центров продаж, сервиса, технической и аналитической поддержки на шести континентах, имеем давнее сотрудничество с высокопрофессиональными дистрибьюторами более чем в 100 странах мира. Для получения более подробной информации о Шимадзу и для связи с Вашим представителем Шимадзу, пожалуйста, посетите наши сайты

[www.shimadzu.ru](http://www.shimadzu.ru)  
[www.shimadzu.com](http://www.shimadzu.com)

 **SHIMADZU**

Kratos Analytical Ltd.  
Wharfside, Trafford Wharf Road, Manchester M17 1GP, UK  
Phone: +44 161 888 4400 Fax: +44 161 888 4402  
URL <http://www.shimadzu.com/an/>

Названия компании, наименования товаров/услуг и логотипы, используемые в настоящей публикации, являются товарными знаками и фирменными наименованиями корпорации Shimadzu или ее филиалов, использованы ли они или нет с символом торговой марки «ТМ» или «®».

Содержание данной публикации может быть изменено без предварительного уведомления. Shimadzu не несет никакой ответственности за любой ущерб, прямой или косвенный, связанный с использованием данной публикации.