

УДК 616-094

<https://doi.org/10.31016/978-5-6048555-6-0.2023.24.78-84>

МОДИФИКАЦИИ СПОСОБА ИДЕНТИФИКАЦИИ АСКАРИД НА БАЗЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Березинская И. С.¹,

младший научный сотрудник лаборатории санитарно-паразитологического мониторинга, медицинской паразитологии и иммунологии

Нагорный С. А.¹,

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории санитарно-паразитологического мониторинга, медицинской паразитологии и иммунологии

Алешукина А. В.¹,

доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования

Мартюшева И. Б.¹,

лаборант-исследователь лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования

Аннотация

В настоящее время диагностика гельминтозных заболеваний основана на микроскопическом наблюдении различных стадий паразитов, но микроскопия субъективна и напрямую связана с компетентностью исследователя. На этом фоне исследователи описали время-пролетную масс-спектрометрию с лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF), как потенциальный инновационный инструмент протеомного анализа для идентификации и дифференциации гельминтов. Цель исследования – поиск альтернативных расходных материалов (лизис-буферов) в связи с импортозамещением. Для исследования брали головные концы *Ascaris lumbricoides* самца и самку (по 5 особей). Сравнительный белковый профиль аскарид по соотношению масса/заряд в программе Flex analysis выявил сходные графики головных частей аскариды (самец и самка), обработанные лизис-буфером из набора «Sepsityper Kit 50» и буфером из набора ПЦР. Результаты исследования показывают возможность видовой дифференциации нематод методом MALDI-TOF MS. Были обнаружены совпадения информационных данных, что позволяет в дальнейшем произвести

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора (344000, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный, д. 119)

замену лизис-буферов. Изучены новые подходы для более тщательной обработки спектров и их визуализации с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper. Показана вероятность замены лизис-буфера из набора «Sepsityper Kit 50» на лизис-буфер, используемый при постановке ПЦР.

Ключевые слова: MALDI-TOF MS, идентификация нематод, молекулярно-биологические методы, *Ascaris lumbricoides*

MODIFICATIONS OF THE ASCARIS IDENTIFICATION METHOD BASED ON MASS SPECTROMETRY

Berezinskaya I. S.¹,

Junior Researcher of the Laboratory of Sanitary and Parasitological Monitoring, Medical Parasitology and Immunology

Nagorniy S. A.¹,

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Sanitary and Parasitological Monitoring, Medical Parasitology and Immunology

Aleshukina A. V.¹,

Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher of the Laboratory of Virology, Microbiology and Molecular Biological Research Methods

Martuyusheva I. B.¹,

Laboratory Assistant Researcher of the Laboratory of Virology, Microbiology and Molecular Biological Research Methods

Abstract

Currently, the diagnosis of helminthic diseases is based on microscopic observation of various stages of parasites, but microscopy is subjective and directly related to the competence of the researcher. Against this backdrop, researchers have described laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) as a potential innovative proteomic analysis tool for helminth identification and differentiation. The purpose of the research is to search for alternative consumables (lysis buffers) in connection with import substitution. For the study, the head ends of *Ascaris lumbricoides*, male and female (5 specimens each) were taken. The comparative protein profile of the ascarids by mass/charge ratio in the Flex analysis program revealed similar graphs of the head parts of the askaris (male and female) processed with lysis buffer from the Sepsityper Kit 50 and with buffer from the

¹ Federal Budgetary Institution of Science "Rostov Scientific Research Institute of Microbiology and Parasitology" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (119, Gazetny lane, Rostov-on-Don, 344000, Russia)

PCR kit. The results of the study show the possibility of species differentiation of nematodes using the MALDI-TOF MS method. Coincidences of informational data were found, which makes it possible to subsequently replace the lysis buffers. New approaches have been studied for more thorough processing of spectra and their visualization using the MALDI Biotyper software. The probability of replacing the lysis buffer from the Sepsityper Kit 50 with the lysis buffer used in PCR was shown.

Keywords: MALDI-TOF MS, nematode identification, molecular biological methods, *Ascaris lumbricoides*

Введение. Аскаридоз представляет серьезную угрозу для здоровья человека и наносит огромные экономические потери в свиноводстве [2]. *Ascaris lumbricoides* и *A. suum* имеют схожую морфологию и генетическую структуру, и иногда эти организмы перекрестно заражают альтернативного хозяина. Поэтому их таксономия противоречива [5]. В настоящее время диагностика гельминтозных заболеваний основана на микроскопическом наблюдении различных стадий паразитов, но микроскопия субъективна и напрямую связана с компетентностью исследователя. На этом фоне исследователи описали время-пролетную масс-спектрометрию с лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF), как потенциальный инновационный инструмент протеомного анализа для идентификации и дифференциации гельминтов [4]. Масс-спектрометрия MALDI-TOF основана на получении профилей белковых спектров, из экстрактов данного патогена. Для окончательной идентификации требуется доступная база данных масс-спектров, содержащая эталонные профили (MSPs) [3]. Цель исследования — поиск альтернативных расходных материалов (лизис-буферов) в связи с импортозамещением.

Материалы и методы. Для исследования брали головные концы *A. lumbricoides* самца и самку (по 5 особей). Для достижения поставленной цели, использовали масс-спектрометрический анализ на базе MALDI Biotyper (Microflex, Bruker Germany), с последующим анализом встроенного программного обеспечения прибора (Flex control, MALDI Biotyper RTC, Flex analysis). Пробоподготовка для масс-спектрометрии осуществлялась с набором «Sepsityper Kit 50» Bruker Germany и ПЦР-буфером Амплисенс (Россия) в качестве импортозамещения. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием раздела Statistica Microsoft Excel.

Результаты исследований. Сравнительный белковый профиль аскарид по соотношению масса/заряд в программе Flex analysis выявил похожие графики головных частей аскариды (самец и самка), обра-

ботанные лизисом из набора «Sepsityper Kit 50» и буфером из набора ПЦР. Были обнаружены совпадения информационных данных, что позволяет в дальнейшем произвести замену лизис-буферов.

На рисунке 1 показан сравнительный белковый профиль самца *A. lumbricoides* при использовании лизис «Sepsityper kit 50» и ПЦР буфера из набора ПЦР «Амплисенс». Показатели масса/заряд совпали в диапазонах от 3255 до 14809 КДа. При этом зафиксированы основные пики в значения масса/заряд 3779 и 3446,4269 и 4270,6330 и 6333,14809 и 14697.

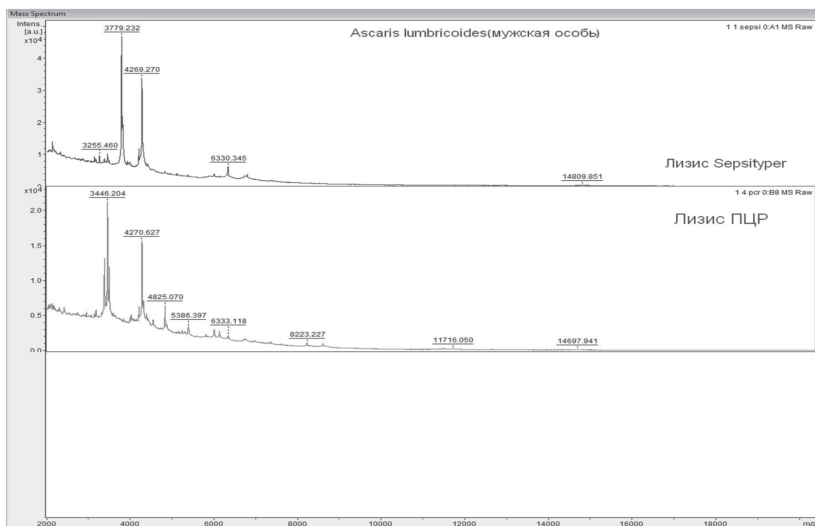


Рис. 1. Сравнительный белковый профиль при использовании лизис-буферов для *A. lumbricoides* (самец) по соотношению масса/заряд в программе Flex analysis

На рисунке 2 показан сравнительный белковый профиль самки *A. lumbricoides* при использовании лизис «Sepsityper kit 50» и ПЦР буфера из набора ПЦР «Амплисенс». Показатели масса/заряд совпали в диапазонах от 2626 до 13313 КДа. При этом зафиксированы основные пики, фиксированные в значения масса/заряд 4003 и 4004,5377 и 5965,7247 и 7250.

Проведен анализ полученных спектров при помощи ССИ (Composite correlation index) матрицы или тепловой карты, которая используется

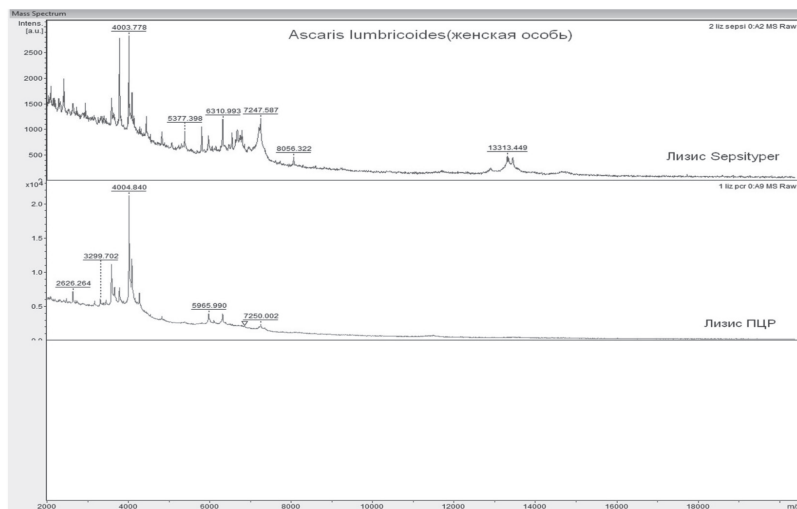


Рис. 2. Сравнительный белковый профиль при использовании лизис-буферов для *A. lumbricoides* (самка) по соотношению масса/заряд в программе Flex analysis

для статистического анализа соотношения спектров. ССИ высчитывается путем деления спектров на дискретные интервалы и сравнения этих интервалов по всему набору данных. Данный вид анализа предназначен для определения соотношения спектров близкородственных организмов. Результаты выводятся в виде таблицы типа «тепловой карты». Цвет квадрата, находящегося на пересечении двух спектров (на осях отображаются их номера), отображает степень их совпадения (темно-красный – полное совпадение; темно-синий – отсутствие совпадения) [1].

На рисунке 3 указаны сокращения: син. – синий цвет, г. – голубой цвет, ор. – оранжевый, зел. – зеленый, жел. – желтый, кр. – красный цвет.

Теплых цветов много, соответственно показана схожесть результатов при обработке разными буферами. «Тепловая карта» показывает наиболее повторяющиеся значения масса/заряд, что может быть использовано при идентификации аскарид.

Заключение. Результаты исследования показывают возможность видовой дифференциации нематод методом MALDI-TOF MS. Метод

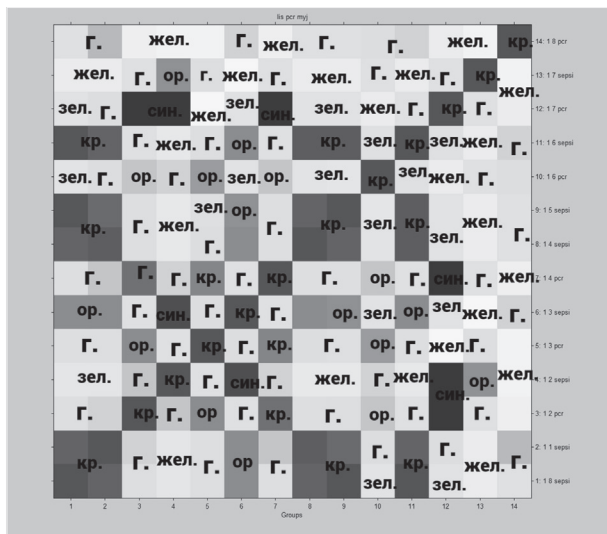


Рис. 3. CCI (Composite correlation index) матрица лизис-буферов на примере *A. lumbricoides* (самец)

масс-спектрометрии может служить эффективным таксономическим инструментом при паразитологических исследованиях. Применение данного метода позволит определять видовую принадлежность не только целых гельминтов, но и их фрагментов, что в значительной степени оптимизирует диагностику паразитарной инвазии при минимальных материальных, временных и трудовых затратах.

Показана вероятность замены лизис-буфера из набора «Sepsityper Kit 50» на лизис-буфер, используемый при постановке ПЦР. Изучены новые подходы для более тщательной обработки спектров и их визуализации с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper.

Список источников

1. Руководство пользователя MALDI Biotyper 3.0. Редакция 1. 2011. 94 с.
2. Eamsobhana P., Yong H. S., Boonyong S., Wanachiwanawin D., Tungtrongchitr A. Genetic diversity and identity of *Ascaris* worms from human and pig hosts in Thailand // *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2022; 33: 100752.
3. Feucherolles M., Poppert S., Utzinger J., Becker S. L. MALDI-TOF mass spectrometry as a diagnostic tool in human and veterinary helminthology: a systematic review // *Parasites & Vectors*. 2019; 12(1): 245.

4. Nagorny S., Aleshukina A., Aleshukina I., Denisenko V., Ermakova L., Pshenichnaya N. Application of Mathematical Models for MALDI-TOF MS on the Example of Dirofilariasis // *International Journal of Infectious Diseases*. 2022; 116: 95.
5. Zhou C., Chen J., Niu H., Ouyang S., Wu X. Study on the population evolution of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* based on whole genome resequencing // *Vet Parasitol*. 2020; 279: 109062.

References

1. User Manual for MALDI Biotyper 3.0. Edition 1. 2011. 94 p. (In Russ.)
2. Eamsobhana P., Yong H. S., Boonyong S., Wanachiwanawin D., Tungtrongchitr A. Genetic diversity and identity of *Ascaris* worms from human and pig hosts in Thailand. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2022; 33: 100752.
3. Feucherolles M., Poppert S., Utzinger J., Becker S. L. MALDI-TOF mass spectrometry as a diagnostic tool in human and veterinary helminthology: a systematic review. *Parasites & Vectors*. 2019; 12(1): 245.
4. Nagorny S., Aleshukina A., Aleshukina I., Denisenko V., Ermakova L., Pshenichnaya N. Application of Mathematical Models for MALDI-TOF MS on the Example of Dirofilariasis. *International Journal of Infectious Diseases*. 2022; 116: 95.
5. Zhou C., Chen J., Niu H., Ouyang S., Wu X. Study on the population evolution of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* based on whole genome resequencing. *Vet Parasitol*. 2020; 279: 109062.