ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА MALDI-TOF MS ДЛЯ ВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ НЕМАТОД (НА ПРИМЕРЕ ИЗУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ПРОФИЛЕЙ АСКАРИДАТ И ДИРОФИЛЯРИЙ)

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, заведующая лабораторией вирусологии,
микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования

Алешукина И. С.¹,

младший научный сотрудник лаборатории вирусологии,
микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования

Ермакова Л. А.¹,

кандидат медицинских наук,
заведующая клиникой инфекционных и паразитарных болезней

Аннотация

В статье приводятся результаты изучения белковых профилей нематод, актуальных для юга России (дирофилярий и аскаридат), с помощью протеомного анализа на основе MALDI-TOF MS. Анализ белковых экстрактов дирофилярий и аскаридат показал спектры с пиками высокой интенсивности в диапазоне 2–20 kDa, качество спектров и интенсивности спектральных пиков согласовывалось у всех образцов одного вида. Отмечено, что в спектрах, полученных от различных дирофилярий (*D. repens* и *D. immitis*) в диапазоне от 3400 до 6000 кДа, наблюдались достоверно частые пики, которые характеризуют весь род нематод. В диапазоне выше 6000 кДа спектры различались по репрезентативным пикам, что позволило дифференцировать один вид от другого по профилю белка.

Профили спектров, полученные из белков аскарид *A. suum* и *A. lumbricoi*, в отличие от дирофилярий, показали почти полную гомологию графических изображений в диапазоне m/z от 3000 кД до 15 000 кДа.

¹ Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора (344000, Россия, г. Ростов-на-Дону, Газетный пер., д. 119), rostovniimp@mail.ru

В то же время пики белка в диапазоне 3000–7300 кДа, характерные для всего рода *Ascaris*, постоянны. Три главных пика у обоих видов были обнаружены в m/z 13 000, 13 400 и 14 400.

Таким образом, метод протеомного анализа на основе MALDI-TOFF MS может служить эффективным инструментом при исследованиях таксономической принадлежности возбудителя.

Ключевые слова: белковый профиль, MALDI TOFF MS, нематоды, диروفиларии, аскариды.

USE OF MALDI-TOF MS METHOD FOR SPECIES DIFFERENTIATION OF NEMATODES (BY EXAMPLE OF STUDYING PROTEIN PROFILES OF ASCARIDATE AND DIROFILARIA)

Nagorniy S. A.¹,

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of Laboratory of sanitary
and parasitological monitoring, medical parasitology and immunology

Aleshukina A. V.¹,

Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Virology,
Microbiology and Molecular-Biological Research Methods

Aleshukina I. S.¹,

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

Ermakova L. A.¹,

Candidate of Medical Sciences, Head of the Clinic of Infectious and Parasitic Diseases

Abstract

The article presents the results of studying protein profiles of nematodes relevant for the south of Russia (dirofilaria and ascaridate) using proteomic analysis based on MALDI-TOF MS. Analysis of the protein extracts of dirofilaria and ascaridate showed spectra with high-intensity peaks in the range of 2–20 kDa, the quality of the spectra and the intensities of the spectral peaks were consistent for all samples of the same species. It was noted that reliably frequent peaks were observed in the spectra obtained from various dirofilariae (*D. repens* and *D. immitis*) in the range from 3400 to 6000 kDa, that characterize the entire genus of nematodes. In the

¹ Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Federal Service on Surveillance for Consumer rights protection and human well-being (119, Gazetnyy alley, Rostov-on-Don, 344000, Russia), rostovniimp@mail.ru

range above 6000 kDa, the spectra differed by representative peaks, which allowed us to differentiate one species from another according to the protein profile.

The spectral profiles obtained from the ascarid *A. suum* and *A. lumbricoi* proteins, unlike dirofilaria, showed almost complete homology of graphic images in the m/z range from 3000 kDa to 15 000 kDa.

At the same time, protein peaks in the range of 3000–7300 kDa, typical for the entire genus *Ascaris*, are constant. Three main peaks in both species were found in m/z 13 000, 13 400 and 14 400.

Thus, the method of proteomic analysis based on MALDI-TOFF MS can serve as an effective tool in studies of the taxonomic identification of the pathogen.

Keywords: protein profile, MALDI-toff MS, nematodes, dirofilaria, ascaridates.

Введение. Новое поколение методов диагностики паразитарных заболеваний базируется на протеомных исследованиях. Самой современной методикой в рамках текущих протеомных стратегий является масс-спектрометрия. Она обладает высокой пропускной способностью и высокой чувствительностью. Преимущество метода матрично-активированной лазерной десорбции ионизации (MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization) заключается в способности анализировать сложные смеси, что делает ее перспективным методом исследования биологического материала.

Целью настоящей работы явилось изучение потенциала методов протеомного анализа на основе MALDI-TOFF MS для таксономической дифференциации нематод.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили головные концы десяти неполовозрелых самок диروفиларий (пять особей каждого вида). Особи *D. repens* были выделены оперативным путем у больных людей из подкожной клетчатки, *D. immitis* из сердца у собак. Из десяти молодых, неполовозрелых аскарид, взятых в исследование, — пять особей *A. lumbricoides* отошли естественным путем у пациентов, пять образцов *A. suum* были выделены из кишечника свиней на бойнях.

Пробоподготовку осуществляли по оригинальной авторской методике [1, 2].

Профили масс белка гомогенизатов получали с использованием Microflex LT MALDI-TOFF MS (Bruker Daltonics) с программным обеспечением Flex Control (Bruker Daltonics) визуализировали с помощью программного обеспечения Flex analysis 3.3 (Bruker Daltonics).

Результаты исследований. Масс-спектрометрический анализ белковых экстрактов диروفиларий показал спектры с высокоинтенсивными пиками в диапазоне 2–20 кДа (рис. 1, рис. 2). Качество спектров (четкое графическое отражение массы и интенсивность спектральных пиков) были одинаковыми во всех образцах одного и того же вида. При использовании программного обеспечения Flex analysis 3.3 отмечено, что в спектрах, полученных от различных диروفиларий (*D. repens* и *D. immitis*) в диапазоне от 3400 до 6000 кДа, наблюдались достоверно частые пики, которые характеризуют весь род нематод. В диапазоне выше 6000 кДа спектры различались по репрезентативным пикам, что позволило дифференцировать один вид от другого по профилю белка. В спектре белка *D. immitis* (рис. 1) достоверно отмечены пики в диапазоне m/z от 8600 до 10 400 кДа, тогда как в спектрах *D. repens* был обнаружен пик в 11 400 кДа (рис. 2).

Масс-спектрометрический анализ профилей белков *A. lumbricoides* (рис. 3) и *A. suum* (рис. 4) показал спектры с высокоинтенсивными пиками в диапазоне 2–20 кДа. Распределение рисунков и интенсивностей спектральных (массообразующих) пиков с одинаковой массой было одинаковым во всех образцах одних и тех же видов аскарид.

В отличие от диروفиларий, при получении масс-спектров аскариды мы обнаружили почти полную гомологию графических изображений в диапазоне m/z от 3000 кД до 15 000 кДа. В то же время пики белка в диапазоне 3000–7300 кДа, характерные для всего рода *Ascaris*, постоянны. Три главных пика у обоих видов были обнаружены в m/z 13 000, 13 400 и 14 400.

Незначительные различия в спектрах аскариды в том же интервале, который, по нашему мнению, характеризует виды нематод, возможно, связаны с тем, что возбудитель аскаридоза человека является эволюционно близким родственником аскариды свиней (потомок).

Морфологическое и геномное сходство этих гельминтов предполагает обязательную патогенность аскариды свиней для человека.

Заключение. Типирование MALDI-TOFF MS обеспечивает быструю и надежную типизацию на уровне видов диروفиларий и аскарид и является достойной альтернативой молекулярному секвенированию. Точная типизация нематод важна в эпидемиологии, например, для понимания биологии *A. suum* у людей.

Дальнейшее проведение исследований масс-спектрометрического анализа *D. repens* и *D. immitis*, *A. suum* и *A. lumbricoides* позволит разделить эталонные масс-спектры для идентификации гельминтов.

Рис. 1 . Белковый профиль *D. immitis*

Рис. 2. Белковый профиль *D. peregrina*

Рис. 3. Белковый профиль *A. lumbricoides*

Рис. 4. Белковый профиль *A. suum*

Литература

1. Нагорный С.А., Алешукина А.В., Алешукина И.С., Ермакова Л.А., Пшеничная Н.Ю. Перспектива применения протеомного анализа на основе MALDI–TOF MS для дифференциации нематод на примере изучения белковых профилей аскарид и диروفиларий // Паразитология. 2019. Т. 53. № 2. С.136–144.
2. Патент: № 2703280 Способ подготовки проб материала для идентификации вида нематод методом MALDI-TOF Biotyper. Заявка на изобретение № 2018139361/04(065383) от 07.11.2018. Нагорный С.А., Алешукина А.В., Алешукина И.С., Ермакова Л.А., Пшеничная Н.Ю., Криворотова Е.Ю.

References

1. Nagorny S.A., Aleshukina A.V., Aleshukina I.S., Ermakova L.A., Pshenichnaya N.Yu. The prospect of using MALDI-TOF MS-based proteomic analysis to differentiate nematodes by examining protein profiles of ascaridate and dirofilaria. *Parasitology*. 2019; 53(2):136–144. (In Russ.)
2. Patent No. 2703280 *Method for preparation of material samples to identify nematode species by MALDI-TOF Biotyper*. Application for invention No. 2018139361/04 (065383) dated 07/11/2018. Nagorny S.A., Aleshukina A.V., Aleshukina I.S., Ermakova L.A., Pshenichnaya N. Y., Krivorotova E.Yu. (In Russ.)