

УДК 616-094

**ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА  
НА ОСНОВЕ MALDI–TOF MS ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ  
НЕМАТОД НА ПРИМЕРЕ ИЗУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ  
ПРОФИЛЕЙ АСКАРИД И ДИРОФИЛЯРИЙ**

© 2019 г. С. А. Нагорный<sup>1\*</sup>, А. В. Алешукина<sup>1</sup>, И. С. Алешукина<sup>1</sup>,  
Л. А. Ермакова<sup>1</sup>, Н. Ю. Пшеничная<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора,  
пер. Газетный 119, Ростов-на-Дону, 344000 Россия

<sup>2</sup>ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, ул. Новогиреевская 3а,  
Москва, 111123 Россия

\* e-mail: ya.parazitov-net@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.10.2018 г.

После доработки 18.11.2018 г.

Принята к публикации 18.11.2018 г.

Приведены результаты изучения белковых профилей нематод, актуальных для юга России (дирофилярий и аскарид), с помощью протеомного анализа на основе MALDI–TOF MS. Анализ белковых экстрактов диروфилярий и аскарид показал спектры с пиками высокой интенсивности в диапазоне 2–20 kDa, качество спектров и интенсивности спектральных пиков согласовывалось у всех образцов одного вида. Профили спектров дирофилярий *D. repens* и *D. immitis* различались по восьми мажорным пикам. Профили спектров, полученные из белков аскарид *A. suum* и *A. lumbricoides*, минимально различались по 5 из 8 мажорных пиков, что создает возможность для дифференциации этих видов по белковому профилю. Таким образом, метод протеомного анализа на основе MALDI–TOF MS может служить эффективным таксономическим инструментом при паразитологических исследованиях.

*Ключевые слова:* белковый профиль, MALDI–TOFF MS, нематоды, дирофилярии, аскариды.

**DOI:** 10.1134/S0031184719020054

Определение возбудителя на основе анализа его белкового спектра (протеомные исследования) является относительно новым направлением лабораторной диагностики инфекционных болезней. В частности, масс-спектрометрический анализ показал свою эффективность в качестве достоверного метода диагностики ряда бактериальных инфекций, прочно заняв свою нишу с начала нового тысячелетия при идентификации возбудителей инфекционных заболеваний в педиатрической практике (Крыжановская и др., 2014).

Первые исследования потенциала MALDI–TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization–Time Off Flight Mass Spectrometry) для изучения белкового профиля нематод с неустановленным геномом были предприняты в 2007 г. специалистами Бразилии (León et al, 2007). В дальнейшем этот метод был применен с целью дифференциации белков протосколексов многокамерного эхинококка (Wang et al, 2009). Корейские специалисты также изучали изменения белкового профиля клеток холангиокарци-

номы, обработанных экскреторно-секреторными антигенами *Clonorchis sinensis* (Pak et al, 2009).

Кроме того, проводились исследования по дифференциации белковых профилей мужских и женских особей возбудителя японского шистосомоза (Yuan et al, 2009). Данный метод показал свою эффективность в качестве способа быстрой диагностики нематод, паразитирующих на сельскохозяйственных культурах (Ahmad et al, 2012).

В Российской Федерации на сегодняшний день методы протеомного анализа в паразитологических исследованиях не применялись. Принимая во внимание опыт зарубежных ученых, мы использовали метод MALDI-TOF MS для изучения белковых профилей нематод, актуальных для юга России: дирофилярий (*Dirofilaria repens* (Railliet et Henry, 1911) и *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) и аскарид (*Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758) и *Ascaris suum* (Goeze, 1782).

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

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования послужили головные концы десяти неполовозрелых самок дирофилярий (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.

Подготовку проб осуществляли по оригинальной авторской методике. Для проведения исследования методом MALDI-TOF MS гельминтов отмывали в изотоническом растворе хлорида натрия, затем отделяли головной конец тела (20 мм), поскольку в районе глотки расположены стихоцитные клетки, или, в случае с *D. repens*, если длина гельминта не превышала 60 мм, то брали паразита целиком. Аскаридат помещали на 24 ч в 0,9 % раствор NaCl с добавлением 100 ед./мл феноксиметилпенициллина (пенициллин V) и 100 мкг/мл стрептомицина. Биологический материал замораживали и пятикратно гомогенизировали механически в замороженном состоянии с последующей обработкой ультразвуком при 70 кГц 5 раз по 30 с в 3 циклах на спиртовой бане (-30 °C). Для лизиса клеток добавляли лизис буфер из набора MALDI SepsityperKit 50 (Bruker) и встряхивали на вортексе 10 с. Для улучшения качества спектра проводили экстракцию в 20 µl 70 % муравьиной кислоты. Затем в пробирку добавляли аналогичное количество (20 µl) 50 % ацетонитрила. Гомогенизаты центрифугировали при 13000 оборотах в минуту в течение 2 мин. 1 µl супернатанта образца наносили на стальную пластину (Bruker) в двух последовательностях. Мишень сушили в течение нескольких минут (5–15) при комнатной температуре. Далее на каждый образец наносили 1 µl матрицы CHCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid), после чего пробы просушивали и помещали в масс-спектрометр для анализа.

Профили масс-белка гомогенизатов получали с использованием Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) с программным обеспечением FlexControl (Bruker Daltonics). Визуализацию проводили с помощью программного обеспечения Flex analysis 3.3 (Bruker Daltonics).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Масс-спектрометрический анализ белковых экстрактов дирофилярий показал спектры с пиками высокой интенсивности в диапазоне 2–20 кДа. Качество спектров и интенсивности спектральных пиков согласовывалось у всех образцов одного вида. При

использовании Flex analysis отмечено, что профили спектров, полученные из белков дирофилярий различных видов, в данном случае *D. repens* и *D. immitis*, различались по восьми мажорным пикам, что позволяет дифференцировать по белковому профилю один вид от другого (рис. 1, 2).

Масс-спектрометрический анализ белковых экстрактов аскарид показывал спектры с пиками высокой интенсивности в диапазоне 2–20 кДа. Распределение паттернов и интенсивности спектральных (масс-пролетных) пиков со схожей массой было единообразным у всех образцов одного вида аскарид, что доказывалось идентичными профилями при наложении масс-спектрометрических пиков друг на друга. Тем не менее, при использовании Flexanalysis отмечено, что профили спектров, полученные из белков аскарид *A. suum* и *A. lumbricoides*, минимально различаются по 5 из 8 мажорных пиков (рис. 3, 4), что делает возможным дифференцировать по белковому профилю один вид от другого.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из относительно новых проблем территорий умеренного климата является единственный трансмиссивный гельминтоз, встречающийся у жителей данных регионов – дирофиляриоз. Следует отметить, что частота инвазии человека двумя основными патогенами данного вида (*D. repens* и *D. immitis*) значительно варьирует в различных континентах и странах (Криворотова 2015), очевидно за счет преобладания того или иного вида филярий у окончательных хозяев – животных семейства псовых, и энтомологической структуры векторов трансмиссии, обусловленной природно-климатическими условиями (Криворотова, 2016). Длительное наблюдение за динамикой видового состава дирофилярий у наиболее эпидемиологически значимого источника инвазии для человека – домашних собак – свидетельствует об изменчивости структуры видов дирофилярий (Nagorny et al., 2018), паразитирующих у данных животных. В последние десять лет отмечается значительное увеличение доли *D. immitis* на юге России. Если в 2000 г. доля инвазии *D. repens* у окончательных хозяев составляла 76.5 %, *D. immitis* 23.5 %, а инвазии 2 паразитами не регистрировались, то в 2010 г. соотношение инвазии *D. repens* к *D. immitis* и к микст составило 1 : 1 : 1 (33.3 %). К 2017 г. экстенсивность инвазии домашних собак *D. repens* составила всего 14.5 %. Однако на сегодняшний день в данном регионе регистрируются в основном случаи инвазии человека *D. repens* (Ермакова et al., 2017). Не исключено, что в данном случае имеет место гиподиагностика инвазии *D. immitis* у жителей юга России. Например, в 2017 г. мы наблюдали случай, предположительно легочного дирофиляриоза, у жительницы Ростовской области (рис. 5). В июле 2018 г. в Воронежской области была прооперирована местная жительница по поводу новообразования в правом лёгком, в гистологических препаратах были обнаружены поперечные срезы *D. immitis*.

«Золотым стандартом» диагностики дирофиляриоза человека является морфологическая идентификация гельминтов, удаленных при хирургическом вмешательстве. Однако в случае повреждения нематоды при хирургическом вмешательстве диагностическая значимость данного метода значительно снижается. Использование масс-спектрометрического метода при анализе фрагментов паразита позволит с высокой точностью определить его видовую принадлежность. По данным зарубежных ученых, данный метод показал высокую диагностическую значимость при диагностике таких протозоозов как лейшманиозы и трихомониаз (Cassagne, 2013; Calderaro, 2016).

В структуре заболеваемости населения геогельминтозами доля инвазии нематодами семейства Ascarididae составляет более 50 %. Однако кишечный аскаридоз человека вызывают только *A. lumbricoides* и *A. suum* (Nejsun et al., 2005; Arizono et al., 2010). В зарубежной литературе обсуждаются генетические особенности и происхождение

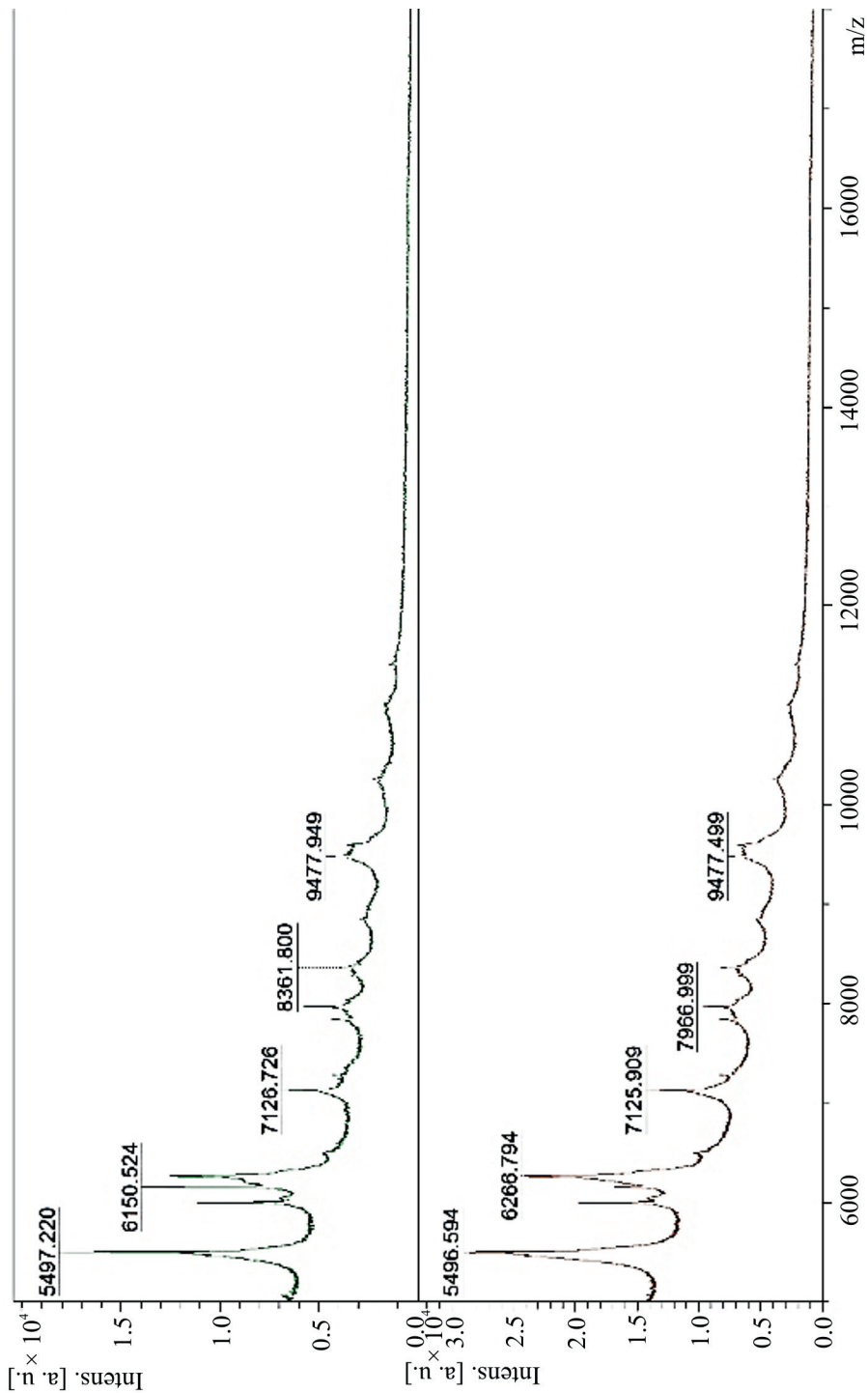


Рис. 1. Белковый профиль *D. repens*.

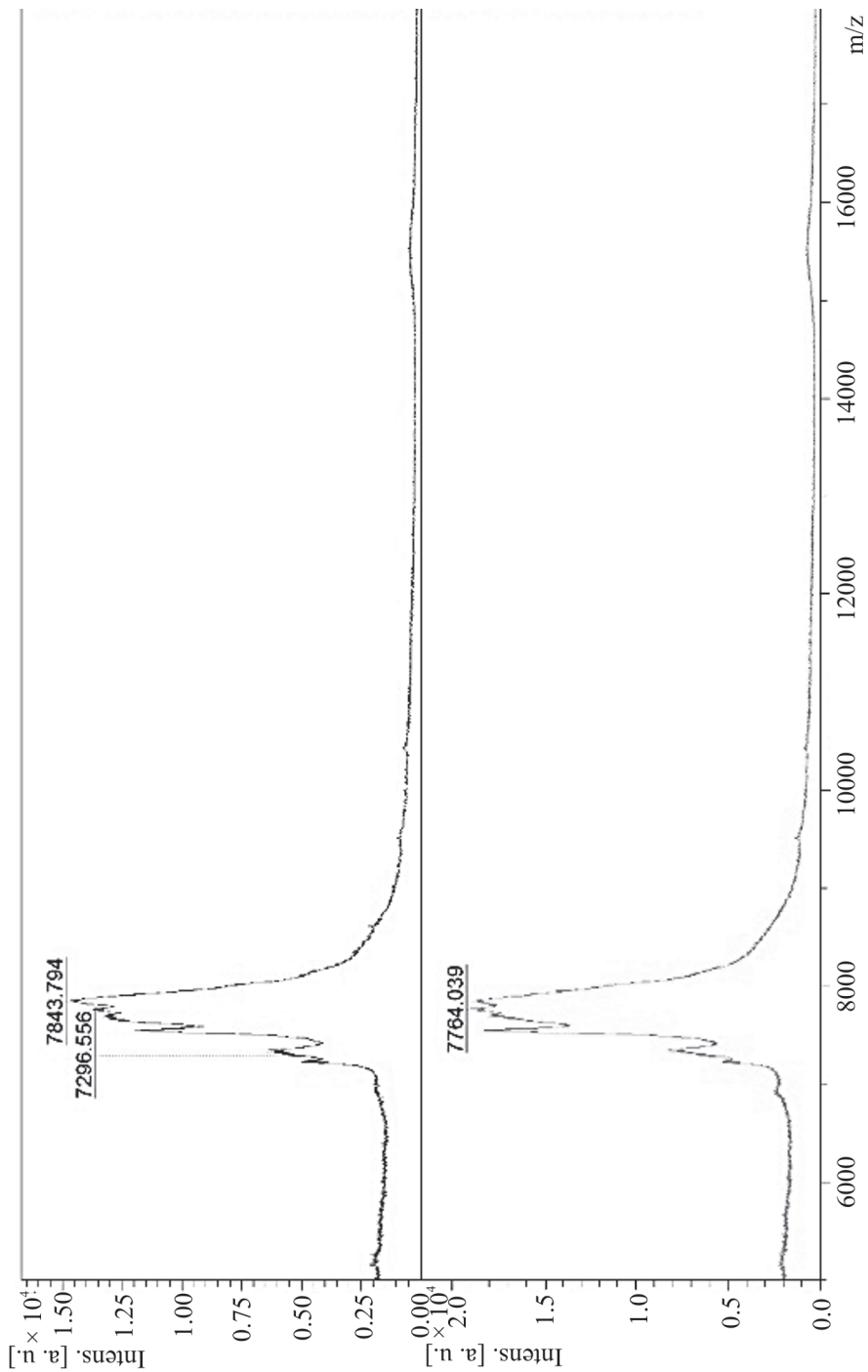


Рис. 2. Белковый профиль *D. immitis*.

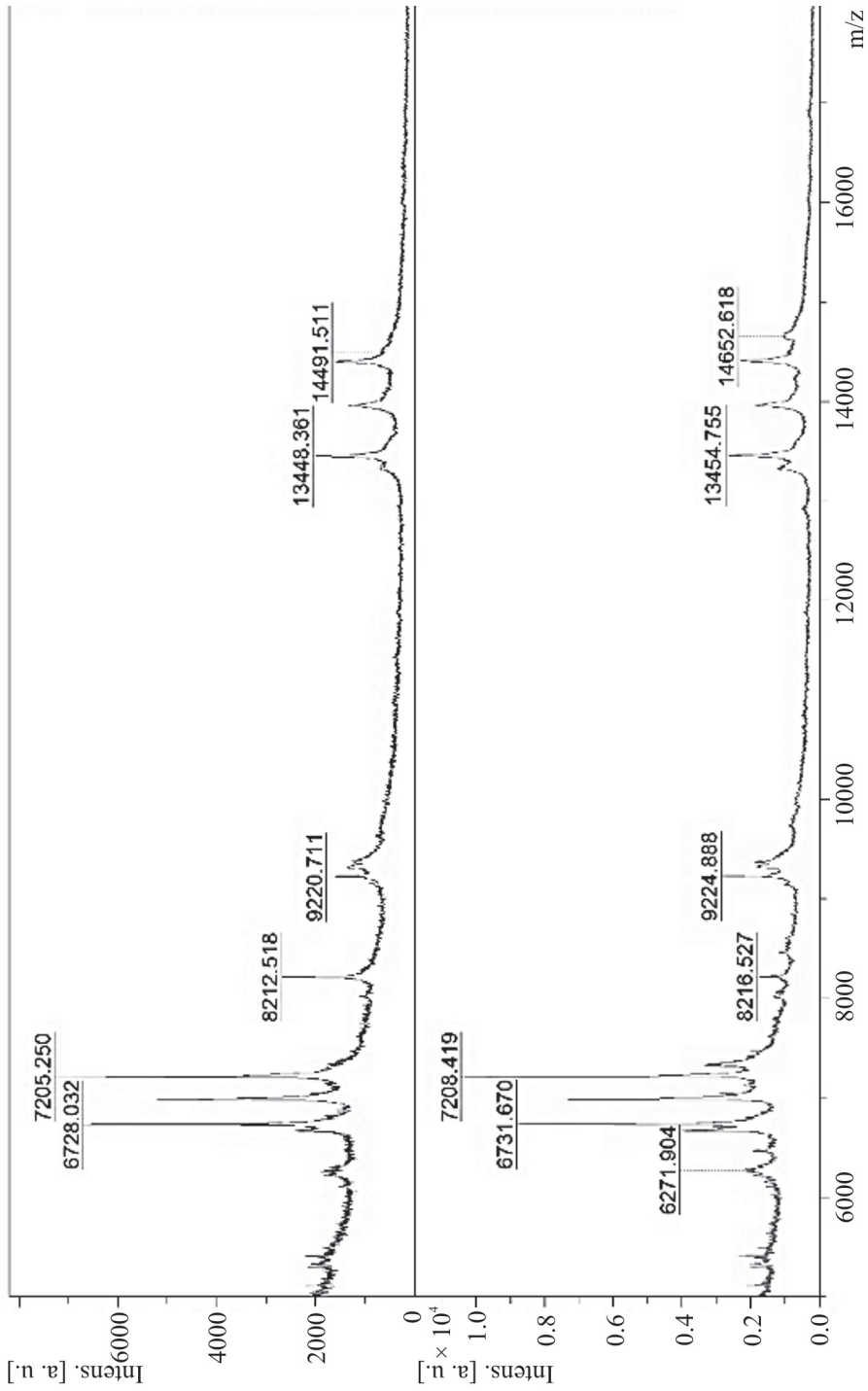


Рис. 3 Белковый профиль *A. lumbricooides*.

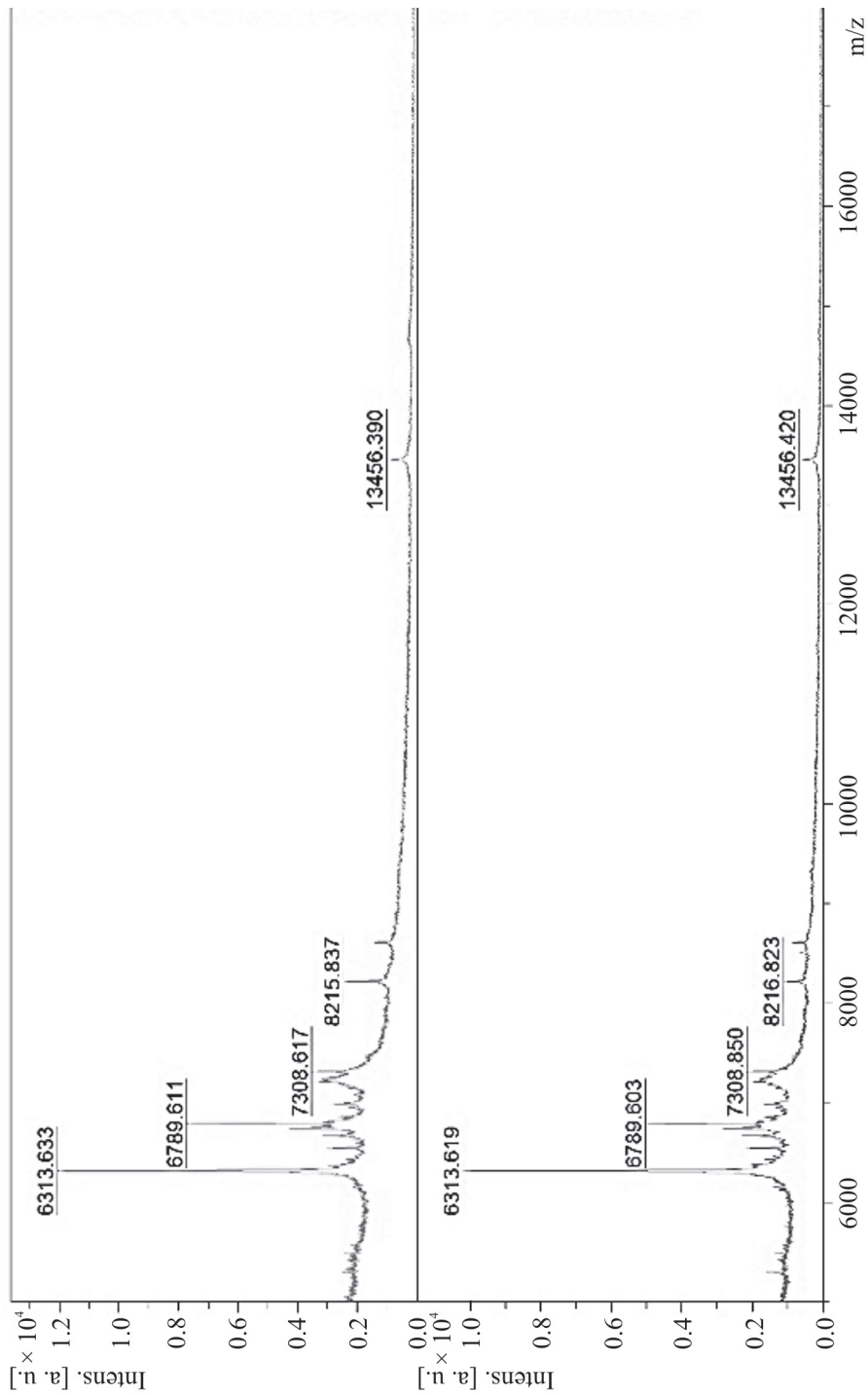


Рис. 4 Белковый профиль *A. suitt*.

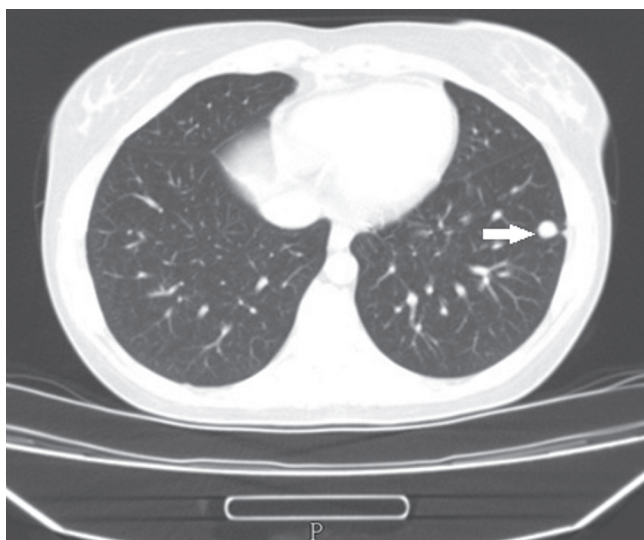


Рис. 5. Компьютерная томограмма легких (июль 2017).

этих двух, наиболее широко распространенных и патогенных для человека видов аскарид. По мнению ряда зарубежных ученых (Leles et al., 2012; Chang-Chun et al., 2014; Betson et al., 2016), эти виды обладают тесным генетическим сродством. С учетом результатов молекулярно-генетического исследования полиморфизма рибосомальной ДНК данных гельминтов (Peng, 2003) авторы предполагают, что *A. lumbricoides* является потомком *A. suum*. В отличие от диروفиллярий, в белковых профилях *A. lumbricoides* и *A. suum* отмечаются минимальные различия, что согласуется с данными зарубежных ученых о близком родстве указанных гельминтов и косвенно подтверждает потенциальную патогенность *A. suum* для человека. (Nejsun et al., 2005; Arizono et al., 2010).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Масс-спектрометрическое биотипирование относится к прямым методам диагностики инфекционных болезней, и, в отличие от традиционной бактериологии, является более экономичным по временным и трудовым затратам. Полученные результаты показывают возможности метода масс-спектрометрии для видовой дифференциации нематод, который может применяться в качестве эффективного таксономического инструмента при паразитологических исследованиях.

MALDI-TOF MS позволит определять видовую принадлежность не только целых гельминтов, но и их фрагментов (в отличие от других методов), что в значительной степени оптимизирует диагностику паразитарной инвазии, в частности диروفилляриоза, при минимальных материальных, временных и трудовых затратах. Создание библиотеки масс-спектрометрических профилей нематод на базе MALDI Sepsityper Kit 50 позволит использовать метод наравне с «золотым стандартом».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Криворотова Е.Ю. 2015. Биологические аспекты диروفилляриоза в ряде субъектов Российской Федерации. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 24 с.
- Криворотова Е.Ю., Нагорный С.А. 2016. Ксеномониторинг диروفилляриоза на юге и северо-западе Российской Федерации. *Паразитология* 5 (50): 357–364.
- Крыжановская О.А., Лазарева А.В., Пономаренко О.А., Катосова Л.К., Тепаев Р.Ф., Карасева О.В., Чеботарь И.В. 2014. Масс-спектрометрическая идентификация возбудителей инфекций кровотока: опыт в педиатрической практике. *Российский педиатрический журнал* 5: 4–9.



- Arizono N., Yoshimura Y., Tohzaka N. et al. 2010. Ascariasis in Japan: is pig-derived *Ascaris* infecting humans? Japan Journal of Infectious Diseases **63** (6): 447–448.
- Ahmad F., Gopal J., Wu H.F. 2012. Rapid and highly sensitive detection of single nematode via direct MALDI Mass Spectrometry. Talanta **93**: 182–5. doi: 10.1016/j.talanta.2012.02.009.
- Betson M., Stothard J.R. 2016. *Ascaris lumbricoides* or *Ascaris suum*: What's in a Name? Japan Journal of Infectious Diseases **213** (8): 1355–1356. doi: 10.1093/infdis/jiw037.
- Calderaro A., Piergianni M., Montecchini S., Buttrini M. et al. 2016. MALDI-TOF mass spectrometry as a potential tool for *Trichomonas vaginalis* identification. BMC Infectious Diseases **16**: 261. doi: 10.1186/s12879-016-1594-z.
- Cassagne C., Pralong F., Jeddi F., et al. 2013. Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clinical Microbiology and Infection. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI **20**, 551–557. doi: 10.1111/1469-0691.12387.
- Chang-Chun Shao, Min-Jun Xu, Alasaad S., et al. 2014. Comparative analysis of microRNA profiles between adult *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. BMC Veterinary Research **10**: 99. doi: 10.1186/1746-6148-10-99.
- León I.R., Neves-Ferreira A.G., Valente R.H., Mota E.M., Lenzi H.L., Perales J. 2007. Improved protein identification efficiency by mass spectrometry using N-terminal chemical derivatization of peptides from *Angiostrongylus costaricensis*, a nematode with unknown genome. Journal of Mass Spectrometry **42** (6): 781–92. doi: 10.1002/jms.1214.
- Ermakova L., Nagorny S., Pshenichnaya N., Ambalov Y., Boltachiev K. 2017. Clinical and laboratory features of human dirofilariasis in Russia. ID Cases **19** (9): 112–115. doi: 10.1016/j.idcr.2017.07.006.
- Leles D., Gardner S.L., Karl R., et al. 2012. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? Parasites and Vectors **20** (5): 42. doi: 10.1186/1756-3305-5-42.
- Nagorny S., Ermakova L., Pshenichnaya N., Krivorotova E., Zhuravlev A. 2018. Epidemiological features of human Dirofilariasis in the south of Russia. International Journal of Infectious Diseases **73** (S): 313–313. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.412>.
- Nejsum P.E., Parker D., Frydenberg J., Roepstorff A. et al. 2005. Ascariasis is a zoonosis in Denmark. Journal of Clinical Microbiology **43** (3): 1142–1148. doi: 10.1128/JCM.43.3.1142-1148.2005.
- Pak J.H., Moon J.H., Hwang S.J., Cho S.H., Seo S.B., Kim T.S. 2009. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in human cholangiocarcinoma cells treated with *Clonorchis sinensis* excretory-secretory products. Journal of Cell Biochemistry **108** (6): 1376–1388. doi: 10.1002/jcb.22368.
- Peng W., Yuan K., Zhou X., Hu M. et al. 2003. Molecular epidemiological investigation of *Ascaris* genotypes in China based on single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. Electrophoresis **24** (14): 2308–2315. doi: 10.1002/jcb.22368.
- Wang Y., Cheng Z., Lu X., Tang C. 2009. *Echinococcus multilocularis*: Proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Experimental Parasitology **123** (2): 162–167. doi: 10.1016/j.exppara.2009.06.014.
- Yuan S.S., Xing X.M., Liu J.J., Huang Q.Y., Yang S.Q., Peng F. 2009. Screening and identification of differentially expressed proteins between adult female and male worms of *Schistosoma japonicum*. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi **43** (8): 695–699.

## PROSPECT OF THE USE OF PROTEOMIC ANALYSIS ON THE BASE OF MALDI-TOF MS FOR DIFFERENTIATION OF NEMATODES WITH AN EXAMPLE OF PROTEIN PROFILES OF ASCARIDES AND DIROFILARIANS

S. A. Nagorny, A. V. Aleshukina, I. S. Aleshukina, L. A. Ermakova, N. Yu. Pshenichnaya

*Key words:* protein profile, MALDI-TOFF MS, nematodes, dirofillarians, ascarides.

### SUMMARY

This paper presents the results of investigation of the protein profiles of nematodes that are relevant for the south of Russia (dirofilaria and ascaris) using the proteomic method MALDI-TOF MS. Analysis of protein extracts of dirofilarians and ascarides showed spectra with high-intensity peaks in the range of 2–20 kDa, the quality of the spectra and the intensity of the spectral peaks were consistent in all samples of the same species. The profiles of the spectra of *Dirofilaria repens* and *D. immitis* differed in eight major peaks. The spectra profiles obtained from *A. suum* and *A. lumbricoides* proteins differed in 5 out of 8 major peaks. MALDI-TOFF MS makes it possible to differentiate one species of nematode from another according to the protein profile. So the method of mass spectrometry can be an effective taxonomic tool in parasitological studies.