

УДК 616-094

<https://doi.org/10.31016/978-5-6046256-9-9.2022.23.38-44>

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
ГЕЛЬМИНТОВ: ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ  
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ  
ПАЗАРИТАРНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

**Алешукина И. С.<sup>1</sup>,**

младший научный сотрудник лаборатории санитарно-паразитологического мониторинга, медицинской паразитологии и иммунологии,  
rostovniimp@mail.ru

**Нагорный С. А.<sup>1</sup>,**

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

**Алешукина А. В.<sup>1</sup>,**

доктор медицинских наук, заведующая лабораторией вирусологии,  
микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования

**Ермакова Л. А.<sup>1</sup>,**

кандидат медицинских наук,  
заведующая клиникой инфекционных и паразитарных болезней

**Денисенко В. В.<sup>1</sup>,**

инженер лаборатории вирусологии, микробиологии  
и молекулярно-биологических методов исследования

**Аннотация**

Масс-спектрометрия в настоящее время используется для идентификации бактерий, микобактерий и некоторых грибов. В отличие от клинической бактериологии, MALDI-TOF MS практически не используется для идентификации паразитов человека и животных. Профили белков гомогенатов получали с использованием Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics Germany) с программным обеспечением Flex Control, визуализировали с помощью программного обеспечения Flex analysis 3.3 (Bruker Daltonics). Анализ белковых экстрактов нематод показал спектры с высокоинтенсивными пиками в диапазоне 2–20 кДа. Незначительные различия в масс-спектрометрических

---

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

спектрах *Ascaris lumbricoides* и *Ascaris suum* в одном и том же интервале, который характеризует виды нематод подтверждает результаты, полученные при полногеномном анализе данных гельминтов, что возбудитель аскаридоза человека является эволюционно близким родственником аскарид свиней (потомок). В высоких диапазонах масс-спектрометрического анализа *Dirofilaria immitis* и *Dirofilaria repens* наблюдались достоверно частые пики, которые, вероятно, характеризуют весь род нематод. В диапазоне выше 6000 кДа спектры различались по репрезентативным пикам, что позволило дифференцировать один вид от другого по профилю белка. Проведен сравнительный анализ масс-спектрометрических пиков гельминтов *D. repens*, *D. immitis* с использованием среды R (MALDIquant). На кластере дендрограмм усредненных масс-спектров было обнаружено, что для двух особей *D. repens*, равно как для двух особей *D. immitis* отделы дендрограмм совпадают с высокой долей вероятности. Для *D. immitis* показатель совпадения составил 100%, для *D. repens* – 70%. Полученные результаты могут лечь в основу создания библиотеки белковых профилей с целью ускоренной и объективной дифференциации диروفиларий.

**Ключевые слова:** *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis*, *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, MALDI-TOF MS, среда R, MALDIquant

## MASS-SPECTROMETRIC STUDIES OF HELMINTHS: INFORMATION TECHNOLOGIES FOR IDENTIFICATION OF PARASITIC INFECTION CAUSES

Aleshukina I. S. <sup>1</sup>,

Junior Researcher of the Laboratory of Sanitary and Parasitological Monitoring,  
Medical Parasitology and Immunology,  
rostovniimp@mail.ru

Nagorniy S. A. <sup>1</sup>,

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

Aleshukina A. V. <sup>1</sup>,

Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Virology,  
Microbiology and Molecular Biological Studies

Ermakova L. A. <sup>1</sup>,

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

---

<sup>1</sup> 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)

**Denisenko V. V.**<sup>1</sup>,Engineer of the Laboratory of Virology, Microbiology  
and Molecular Biological Research Methods**Abstract**

Mass spectrometry is currently used to identify bacteria, mycobacteria and some fungi. Unlike clinical bacteriology, MALDI-TOF MS is practically not used for the identification of human and animal parasites. Homogenate protein profiles were obtained using Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics Germany) with Flex Control software, visualized using Flex analysis 3.3 software (Bruker Daltonics). Analysis of protein extracts of nematodes showed spectra with high intensity peaks in the range of 2–20 kDa. Slight differences in the mass spectrometric spectra of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* in the same range, which characterizes nematode species, confirm the results obtained in full-genome analysis of helminth data that the causative agent of human ascariasis is an evolutionarily close relative of swine ascarids. In the high ranges of mass spectrometric analysis of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*, significantly frequent peaks were observed, which probably characterize the whole genus of nematodes. In the range above 6000 kDa, the spectra differed in representative peaks, which allowed to differentiate one species from another in protein profile. A comparative analysis of the mass spectrometric peaks of helminths *D. repens*, *D. immitis* using R medium (MALDIquant). On the cluster of dendrograms of averaged mass spectra, it was found that for two individuals of *D. repens*, as well as for two individuals of *D. immitis*, the sections of the dendrograms coincide with a high degree of probability. For *D. immitis*, the coincidence rate was 100%, for *D. repens* 70%. The results obtained can form the basis for the creation of a library of protein profiles with the aim of accelerated and objective dirofilaria differentiation.

**Keywords:** *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis*, *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, MALDI-TOF MS, medium R, MALDIquant

**Введение.** В последние десятилетия MALDI-TOF MS широко внедряется в качестве диагностического метода в микробиологических лабораториях, придя на смену другим прямым методам идентификации патогенов, благодаря его высокой диагностической точности, скорости выполнения исследования и минимальной трудозатратности [4]. В последние годы изучается потенциал MALDI-TOF MS для идентификации простейших и гельминтов человека и животных [2, 5]. Ограничением метода MALDI-TOF MS является отсутствие

---

<sup>1</sup> 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)

на сегодняшний день эталонных белковых профилей паразитарных патогенов, а также необходимость систематического обновления баз данных [1]. В перспективе масс-спектрометрические исследования на основе MALDI-TOF MS значительно оптимизируют диагностику паразитарных инвазий и позволят определять видовую принадлежность не только целых гельминтов и их фрагментов наравне с молекулярно-генетическим методом.

Цель настоящей работы изучение потенциала метода MALDI-TOF MS для таксономической дифференциации гельминтов путем создания эталонных белковых профилей *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis* с использованием информативных технологий на базе масс-спектрометрии.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования послужили 200 спектров *D. repens*, 150 спектров *D. immitis*, 75 спектров *A. lumbricoides* и 70 спектров *A. suum*. Идентификацию видов нематод (диروفиларий и аскарид) проводили по морфологическим признакам. Для получения белковых профилей использовали головные концы гельминтов, пробоподготовку проводили по оригинальной авторской методике [3]. Профили белков гомогенизатов получали с использованием Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) с программным обеспечением Flex Control, визуализировали с помощью программного обеспечения Flex analysis 3.3 (Bruker Daltonics), с последующим анализом встроенного программного обеспечения прибора (Flex control, MALDI Biotyper RTC, Flex analysis). Для математической обработки масс-спектрограмм использовали программную среду R (MALDIquant).

**Результаты исследований.** Анализ белковых экстрактов нематод показал спектры с высокоинтенсивными пиками в диапазоне 2–20 кДа. Незначительные различия в масс-спектрометрических спектрах *A. lumbricoides* и *A. suum* в одном и том же интервале, который характеризует вид нематод подтверждает результаты, полученные при полногеномном анализе данных гельминтов, что возбудитель аскаридоза человека является эволюционно близким родственником аскарид свиней (потомок). Морфологическое, геномное и протеомное сходство этих гельминтов свидетельствует в пользу потенциальной патогенности аскарид свиней для человека (рис. 1).

В высоких диапазонах масс-спектрометрического анализа *D. immitis*, *D. repens*, наблюдались достоверно частые пики, которые, вероятно, характеризуют весь род нематод (рис. 2). В диапазоне выше 6000 кДа

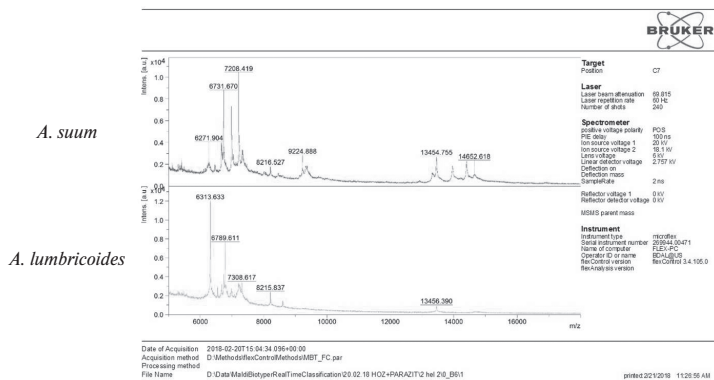


Рис. 1. Сравнительный белковый профиль *A. suum* и *A. lumbricoides*

спектры различались по репрезентативным пикам, что позволило дифференцировать один вид от другого по профилю белка.

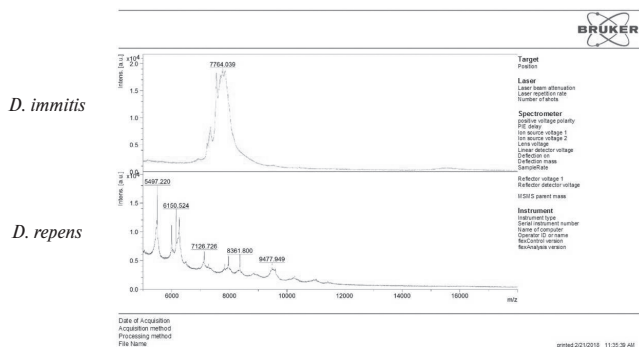


Рис. 2. Сравнительный белковый профиль *D. immitis* и *D. repens*

Для эксперимента по 2 особи *D. immitis* и *D. repens* анализировали методом MALDI-TOF MS в пяти повторностях. Полученные белковые профили обработали в программном продукте MALDIquant в среде R. Полученные кластеры дендрограмм позволили выявить не только родовые, но и видовые отличия изучаемых нематод. С помощью

программы MALDIquant была построена дендрограмма усредненных масс-спектров. Было обнаружено, что для двух особей *D. immitis* показатель совпадения составил 100%, а для 2 особей *D. repens* – 70%, возможно, за счет фенотипических отличий: 2 особи *D. immitis* были получены от 1 хозяина, а 2 особи *D. repens* – от 2 разных человек.

**Заключение.** Результаты исследования показывают возможность видовой дифференциации нематод методом MALDI-TOF MS. Метод 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, в частности, дирофиляриоза при минимальных материальных, временных и трудовых затратах.

Создание математической модели, позволяющей накапливать и анализировать полученные спектры разных гельминтов, позволит создать библиотечную базу масс-спектров нематод для дифференциальной диагностики видовой принадлежности как самих гельминтов, так и их частей, и фрагментов.

#### Список источников

1. *Ермакова Л. А.* и др. Клинические и лабораторные аспекты инвазии *Dirofilaria repens* человека // Инфекционные болезни. 2018. Т. 16. № 1. С. 51-57.
2. *Нагорный С. А.* и др. Использование метода MALDI-TOF MS для видовой дифференциации нематод (на примере изучения белковых профилей аскаридат и дирофилярий) // Сб. науч. ст. по матер. докл. научн. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». 2020. № 21. С. 267-275.
3. Патент № 2703280 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/483, A61K 39/00. Способ подготовки проб материала для идентификации вида нематод методом MALDI TOFF Biotyper: № 2018139361: заявл. 07.11.2018: опубл. 16.10.2019 / *А. В. Алешукина, И. С. Алешукина, Л. А. Ермакова* [и др.]; заявитель Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» (ФБУН «Ростов НИИ микробиологии и паразитологии»).
4. *Ahmad F., Gopal J., Wu H. F.* Rapid and highly sensitive detection of single nematode via direct MALDI Mass Spectrometry // Talanta. 2012; 93: 182-185.
5. *Nagorny S. A.* et al. The application of proteomic methods (MALDI-toff MS) for studying protein profiles of some nematodes (dirofilaria and ascaris) for differentiating species // International Journal of Infectious Diseases. 2019; 82: 61-65.

---

### References

1. Ermakova L. A. et al. Clinical and laboratory aspects of human *Dirofilaria repens* invasion. *Infectious Diseases*. 2018; 16(1): 51-57. (In Russ.)
2. Nagorny S. A. et al. Using the MALDI-TOF MS method for species differentiation of nematodes (on the example of the study of protein profiles of ascaris and dirofilaria). *Materials of the Scientific Conference "Theory and practice of parasitic disease control"*. 2020; 21: 267-275. (In Russ.)
3. Patent No. 2703280 C1 Russian Federation, IPC G01N 33/483, A61K 39/00. Method of preparation of samples of material for identification of nematode species by the MALDI TOFF Biotyper method: No. 2018139361: application 07.11.2018: publ. 16.10.2019 / A. V. Aleshukina, I. S. Aleshukina, L. A. Ermakova [et al.]; applicant Federal Budgetary Institution of Science "Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology" (Federal Budgetary Institution of Science "Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology"). (In Russ.)
4. Ahmad F., Gopal J., Wu H. F. Rapid and highly sensitive detection of single nematode via direct MALDI Mass Spectrometry. *Talanta*. 2012; 93: 182-185.
5. Nagorny S. A. et al. The application of proteomic methods (MALDI-toff MS) for studying protein profiles of some nematodes (dirofilaria and ascaris) for differentiating species. *International Journal of Infectious Diseases*. 2019; 82: 61-65.