

УДК: 543.51; 579.62; 57.088.5

DOI: 10.14427/jipai.2021.4.42

Применение МАЛДИ масс-спектрометрии для видовой и внутривидовой дифференциации дерматофитов *Microsporum canis* антропонозного и зоонозного происхождения

Р.С. Овчинников¹, Н.Б. Поляков², А.И. Соловьев², А.Г. Гайнуллина¹, В.А. Савинов¹,
А.В. Капустин¹, А.М. Гулюкин¹

¹ ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», Москва

² Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

Application of MALDI mass spectrometry for species identification and intraspecific differentiation of dermatophyte *Microsporum canis* of anthroponotic and zoonotic origin

R.S. Ovchinnikov¹, N.B. Polyakov², A.I. Soloviev², A.G. Gainullina¹, V.A. Savinov¹, A.V. Kapustin¹,
A.M. Gulyukin¹

¹ Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center VIEV» (FSC VIEV)

² The Federal Government Budgetary Institution «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation»

Аннотация

Дерматофит *Microsporum canis* является важным грибковым патогеном, который в основном передается человеку от домашних животных. Разные штаммы *M. canis* могут отличаться по способности инфицировать человека. Сравнительные исследования штаммов *M. canis* от человека и животных с использованием МАЛДИ масс-спектрометрии до настоящего времени не публиковались. В сравнительном аспекте были изучены штаммы *M. canis*, выделенные от человека (HS 09-18) и кошки (FC 19-18). Сравнение полученных масс-спектров выявило, что у штамма *M. canis* HS 09-18 имелись характеристичные пики с m/z 3339, 4287, 6485, 7740 и 8568, тогда как у *M. canis* FC 19-18 были выявлены уникальные пики с m/z 5192, 7221 и 8049. Три пика с максимальной интенсивностью в масс-спектре с m/z 6112, 6828, 9625 были обнаружены у обоих штаммов *M. canis*. Дендрограмма, построенная на основании МАЛДИ масс-спектров, позволила выявить кластеризацию штаммов *M. canis*, которая отражает их происхождение – штаммы от кошек и людей образовали два отдельных кластера. Таким образом, были продемонстрированы четкие различия между штаммами *M. canis* в зависимости от источника происхождения (кошка и человек). МАЛДИ масс-спектрометрия позволяет проводить видовую идентификацию, а также выявлять внутривидо-

Summary

Microsporum canis is an important fungal pathogen that is mainly transmitted to humans from domestic animals. Different strains of *M. canis* vary in their ability to infect humans. Comparative studies of *M. canis* strains from humans and animals using MALDI mass spectrometry have not yet been published. In a comparative aspect, *M. canis* strains isolated from human (HS 09-18) and cat (FC 19-18) were studied. Comparison of the obtained mass spectra revealed that *M. canis* HS 09-18 displayed characteristic peaks with m/z 3339, 4287, 6485, 7740 and 8568, while *M. canis* FC 19-18 displayed unique peaks with m/z 5192, 7221 and 8049. Three peaks with maximum intensity with m/z 6112, 6828, 9625 were found in both *M. canis* strains. The dendrogram built on the basis of MALDI mass spectra revealed the clustering of *M. canis* strains in accordance with their origin: strains from cats and humans formed two separate clusters. Thus, clear differences were demonstrated between *M. canis* strains depending on the source of origin (cat and human). MALDI mass spectrometry makes it possible to carry out species identification, as well as to reveal intraspecific differences in *M. canis*. The mechanisms that allow dermatophytes to switch from zoophilic to anthropophilic behavior need to be further explored.

вые отличия у дерматофита *M. canis*. Механизмы, которые позволяют дерматофитам переходить от зоофильного к антропофильному характеру паразитизма, должны быть дополнительно изучены.

Ключевые слова

Дерматофиты, дерматофитозы, *Microsporum canis*, малди, масс-спектрометрия, зооантропонозы.

Введение

Дерматофит *Microsporum canis* – значимый зооантропонозный возбудитель, вызывающий дерматофитозы как человека, так и животных. В течение последних десятилетий заболеваемость людей микроспорией, вызываемой *M. canis*, сильно возросла в странах Европы [1]. При этом значительную часть заболевших составляют дети [2].

В большинстве случаев источником заражения при микроспории являются домашние животные (кошки, собаки, морские свинки и др). При этом недостаточно внимания уделяется изучению факторов возникновения дерматофитозов, связанных с животными [3]. В частности, недостаточно изучено, отличаются ли различные штаммы *M. canis* по степени вирулентности для человека. Очень важной эпидемиологической проблемой является выявление генотипических и фенотипических детерминант, присущих зоофильным и антропофильным штаммам *M. canis* [4]. Это может открыть перспективы для новых методов профилактики и лечения зооантропонозных дерматофитозов и таким образом снизить заболеваемость этими инфекциями.

В последние годы в микологическую практику активно внедряется метод МАЛДИ масс-спектрометрии, в частности для видовой идентификации грибов-дерматофитов. Однако точность такой идентификации варьирует от 13,5 до 100% [5]. Необходимы дальнейшие исследования по применению метода МАЛДИ на дерматофитах.

Также данный подход открывает интересные перспективы в поиске межштаммовых различий у грибов одного вида [6]. Насколько нам известно, сравнительные исследования штаммов *M. canis* из разных источников с использованием МАЛДИ масс-спектрометрического анализа на сегодняшний день не опубликованы.

В данной работе была проведена идентификация штаммов *M. canis* методом МАЛДИ масс-спектрометрии с использованием различных баз данных, а также проведено сравнительное исследование свойств штаммов *Microsporum canis*, выделенных от человека и животных (кошек).

Keywords

Dermatophytes, dermatophytosis, *Microsporum canis*, maldi, mass spectrometry, zooanthroponosis.

Были изучены морфологические особенности и получены масс-спектрометрические профили исследуемых грибов.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов

Клинические штаммы *M. canis* были выделены авторами в Лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова ФНЦ ВИЭВ РАН при посеве клинического материала на дифференциально-диагностическую среду ДТМ-Эксперт (ФНЦ ВИЭВ, Россия). Зоофильный штамм *M. canis* FC 19-18 был выделен от кошки с клиническими признаками дерматофитоза. Антропофильный штамм *M. canis* HC 09-18 был выделен от владельца кошки, также с признаками дерматофитоза. Таким образом, кошка явилась источником заражения дерматофитозом для своего хозяина.

Клинические штаммы *M. canis* были идентифицированы на основании макро- и микроморфологических признаков в соответствии с микологическим определителем De Hoog S. et al (2021). Световую микроскопию проводили на микроскопе MX-100 (Microoptix, Австрия), в сухой системе при увеличении x400.

Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией и ионизацией (МАЛДИ масс-спектрометрия)

Экстракцию белков и пептидов проводили как предложено в [7] с незначительными изменениями.

Изолированные колонии грибов собирали с поверхности агаризованной среды пластиковой микробиологической петлей объемом 1 мкл и ресуспендировали в 300 мкл деионизированной воды. К полученной взвеси добавляли 900 мкл 96% этанола, затем смесь тщательно перемешивали и центрифугировали при 18 894 x g в течение 2 мин. Полученный супернатант отбирали и высушивали на воздухе для испарения остатков этанола.

В полученный осадок вносили 5-40 мкл 70% муравьиной кислоты (в зависимости от объема осадка) и равный объем ацетонитрила. Затем смесь повторно центрифугировали при 18 894 x g в течение 2 мин. Полученный в результате супернатант использовался для масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ

Супернатант, содержащий белковый экстракт, наносили в объеме 1 мкл на 386-луночную стальную мишень (Bruker Daltonics, Германия) и высушивали при комнатной температуре. Затем на поверхность высушенного экстракта наносили 1 мкл раствора матрицы (насыщенный раствор α -Циано-4-гидроксикоричной кислоты (Sigma Aldrich, США) с 50% содержанием ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты (Pancreas, США). Раствор также высушивали при комнатной температуре.

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре UltrafleXtreme (Bruker daltonics, Германия), оснащенном Nd:Yag-лазером (355 нм). Использовали линейный режим, детектировали положительно заряженные ионы в диапазоне от 2000 до 20000 Th. Применяли настройки ионного источника: напряжение на IS1 – 20 кВ, IS2 – 19 кВ, напряжение на линзах – 4,5 кВ; напряжение питания детектора – 2885 В, коэффициент усиления – 12,6.

Для съемки масс-спектров использовали программу Flex Control (v.3.4, build 135) в автоматическом режиме. Частота лазера – 2 кГц, точки обстрела лазером на мишени выбирались случайным образом («random walk»), суммировалось 1200 спектров с 200 точек обстрела.

В качестве стандарта для калибровки и положительного контроля использовали белковый экстракт *Escherichia coli* штамм DH5 α с дополнительными белками (РНКаза А [M+H]⁺ 13 683.2 Да, Миоглобин [M+H]⁺ 16 952.3 Да) (кат. номер 255343, Bruker Daltonics, Германия).

Анализ масс-спектров

Полученные масс-спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения MALDI biotyper Compass Explorer 4.1 (Bruker Daltonics, Германия). Был использован стандартный метод препроцессинга (Biotyper Preprocessing Standard Method).

Вывод о видовой принадлежности гриба делали на основании значения индекса совпадения [8] (параметр score value – SV). Значение SV \geq 2,3 соответствовало достоверной идентификации

до уровня вида; SV менее 2,299, но более 2,000 – достоверной идентификации до уровня рода, вероятной идентификации до вида, значение SV в диапазоне 1,7–1,999 рассматривали как вероятную идентификацию до уровня рода. Значение менее 1,7 расценивалось как недостоверная идентификация.

Параллельно для интерпретации полученных масс-спектров использовали открытую онлайн-платформу MSI (Mass Spectrometry Identification platform, <https://biological-mass-spectrometry-identification.com/>), разработанную в университете Aix-Marseille Université (Франция) специально для видовой идентификации грибов [9]. При идентификации достоверным считалось значение SV (score value) \geq 17.

Построение MSP-дендрограмм (MSP – main spectra profiles) проводилось с помощью программы MALDI biotyper Compass Explorer 4.1 («Bruker Daltonics», Германия).

Результаты и обсуждение

Морфологические свойства штаммов *M. canis* FC 19-18 и *M. canis* HS 09-18. На среде ДТМ-Эксперт оба штамма формировали серовато-белые шерстистые колонии, типичные для дерматофитов, что сопровождалось покраснением среды вследствие ее защелачивания (рис. 1). При микроскопии у обоих штаммов обнаруживали септированный гиалиновый мицелий, а также многоклеточные макроконидии веретеновидной формы с клювовидными кончиками (рис. 2). На основании этих морфологических признаков оба штамма были идентифицированы как *Microsporum canis*.

При посеве уколом на среду Сабуро у штаммов были выявлены определенные морфологические отличия (рис. 3).

Колонии штамма *M. canis* FC 19-18 были белые, бархатистые, с секторизирующим ростом. Колонии штамма *M. canis* HS 09-18 были светло-коричневого цвета, шерстистые, с концентрической зональностью роста. Микроморфологических отличий выявлено не было.

Результаты идентификации штаммов методом МАЛДИ масс-спектрометрии с использованием различных поисковых платформ (MALDI-Biotyper (Bruker) и MSI) представлены в таблице 1.

При использовании для идентификации базы данных Bruker оба штамма были идентифицированы как *Microsporum canis*, однако значения SV у штаммов FC 19-18 и HS 09-18 были значительно ниже порогового (1,56 и 1,60

соответственно). Результаты были оценены как «недостовверная идентификация».

При использовании платформы MSI оба штамма были идентифицированы как вид *Arthroderma otae*, который является телеоморфой *Microsporum canis*. При этом уровень достоверности SV у обоих штаммов был значительно выше порогового (25,12882066 у штамма FC 19-18 и 31,35865795 у штамма HS 09-18). Результат интерпретирован как «высокодостоверная идентификация».

Сравнительный анализ масс-спектров штаммов *M. canis* HS 09-18 и *M. canis* FC 19-18 представлен на рис. 4.

Сравнение масс-спектров выявило наличие характерных пиков у антропофильного штамма *M. canis* HS 09-18 с m/z 3339, 4287, 6485, 7740 и 8568, которые отсутствовали или были очень слабо выражены у зоофильного штамма *M. canis* FC 19-18. В то же время у зоофильного штамма наблюдались характерные пики с m/z 5192, 7221 и 8049. Два наиболее интенсивных пика в масс-спектре с m/z 6112, 6828 и пик с m/z 9625 присутствовали у обоих штаммов.

Для оценки сходства и различий масс-спектров у штаммов *M. canis* зоонозного и антропонозного происхождения была построена MSP-дендрограмма, куда помимо испытуемых штаммов были дополнительно включены клинический штамм *M. canis* Fc 2 (от кошки) и коллекционный штамм *M. canis* 30 VML (база масс-спектров Bruker Biotyper). Результат построения MSP-дендрограммы представлен на рис. 5.

Как видно из дендрограммы, наблюдается кластеризация штаммов *M. canis* в зависимости от их происхождения. Один кластер образовали зоонозные штаммы *M. canis* FC 19-18 и FC2-18. Второй кластер образован антропонозными штаммами *M. canis* HS 09-18 и 30 VML.

Известно, что природные популяции дерматофитных грибов, включая *M. canis*, неоднородны. Они состоят из разных линий, имеющих как генетические, так и фенотипические различия. Эти линии обладают различным патогенным потенциалом для животных и человека. Однако в современной литературе очень мало исследований, которые бы изучали в сравнительном аспекте зоофильные и антропофильные штаммы дерматофитов. Используя генетический подход, были дифференцированы три популяции *M. canis* [4]. Популяция III содержала 44% изолятов от животных и только 9% изолятов от человека. Популяция I со строго клональным воспроизводством содержала 74% изолятов от людей, но только 23% изолятов от животных. На основа-

нии этих результатов был сделан вывод, что популяционная дифференциация *M. canis* скорее связана с появлением вирулентного генотипа, который имеет высокий потенциал инфицирования человека-хозяина.

В настоящем исследовании было обнаружено, что штаммы *M. canis* различного происхождения обладают как морфологическими различиями, так и различиями на уровне масс-спектров, что подтверждает наличие популяционной дифференциации.

Видовая идентификация грибов-дерматофитов методом МАЛДИ масс-спектрометрии представляется перспективным методом, однако в настоящее время точность такой идентификации довольно низкая. По данным [10], лишь 47% клинических изолятов дерматофитов были корректно идентифицированы до уровня вида.

Базы масс-спектров, поставляемые производителями масс-спектрометров, как правило, содержат ограниченное количество грибов-дерматофитов, что значительно снижает точность идентификации. Некоторые авторы создают свои «домашние» базы масс-спектров дерматофитов, дополняя базу данных производителя [11]. Однако такой подход применим лишь для крупных лабораторий, где наряду с МАЛДИ масс-спектрометрией доступны методы генетического секвенирования.

Решением проблемы может стать создание специализированных микологических баз данных для идентификации грибов на основании анализа готовых масс-спектров. Так, на базе университета Aix-Marseille Université (Франция) была создана онлайн-платформа MSI с открытым доступом, специализированная для идентификации патогенных грибов. Наши исследования показывают, что она обеспечивает более достоверную идентификацию дерматофитов, нежели программное обеспечение от Bruker.

В доступной литературе очень мало графических изображений масс-спектров грибов-дерматофитов, что затрудняет сравнительный анализ полученных нами данных. Нам удалось найти один масс-спектр *M. canis* в публикации [11]. Однако там заметен лишь один крупный пик в области ок. 4100 m/z , который не выражен в масс-спектрах, полученных в наших исследованиях.

Мы выявили два значительных пика с m/z 6112 и 6828, которые наблюдались как у зоофильных, так и антропофильных штаммов *M. canis*. Полученные нами спектры имеют общие пики со спектрами трех антропофильных

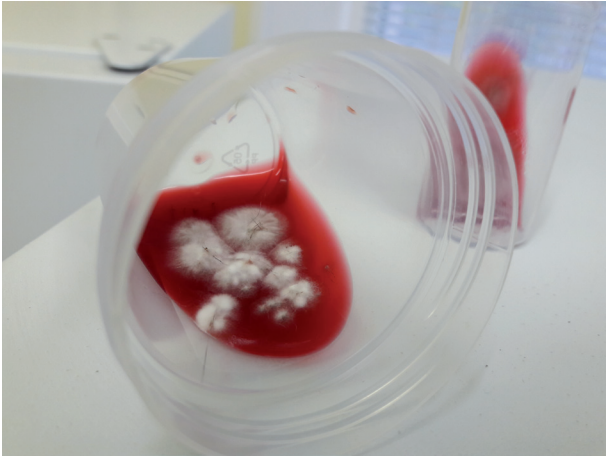


Рис. 1. Рост колоний *M. canis* на среде ДТМ-Эксперт при первичном посеве патматериала

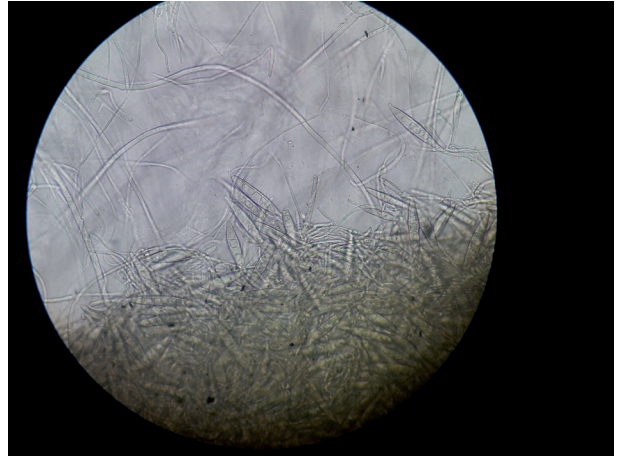


Рис. 2. Макроконидии, характерные для *M. canis*

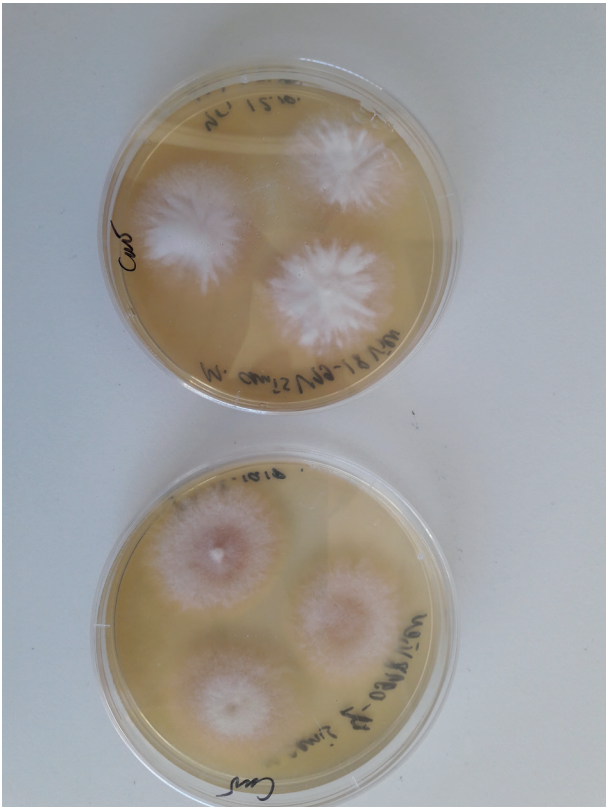


Рис. 3. Морфологические отличия штаммов *M. canis* FC 19-18 от кошки (слева) и человека *M. canis* HS 09-18 (справа)

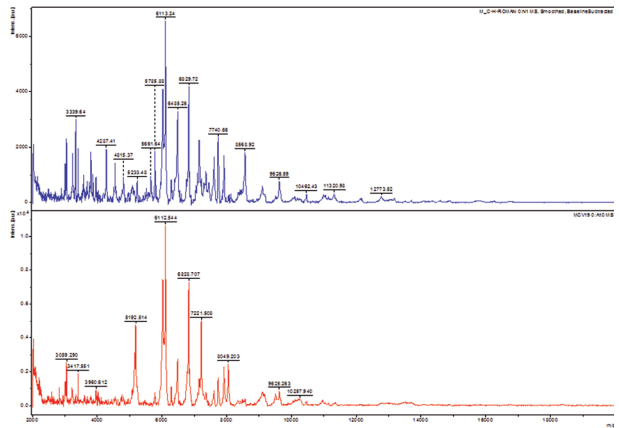


Рис. 4. Масс-спектры штаммов *M. canis* HS 09-18 (вверху) и *M. canis* FC 19-18 (внизу). На оси Y – абсолютная интенсивность ионов. На оси X – массовое число иона m/z

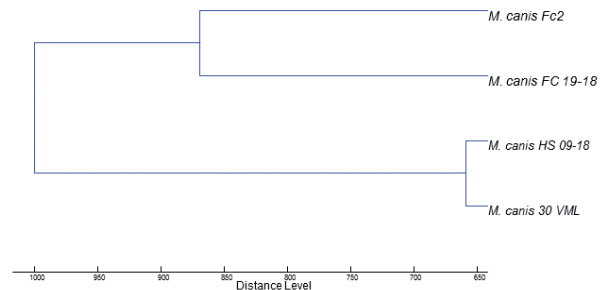


Рис. 5. MSP-дендрограмма масс-спектров четырех штаммов *M. canis* зоонозного и антропонозного происхождения

Таблица 1. Идентификация штаммов *M. canis* FC 19-18 и *M. canis* HS 09-18 методом МАЛДИ масс-спектрометрии

Использованные базы данных	Результат видовой идентификации	Значение SV	Интерпретация степени достоверности
Штамм FC 19-18			
Bruker MALDI Biotyper Database	<i>Microsporum canis</i>	1,56	Недостоверная идентификация
MSI (Mass Spectrometry Identification platform)	<i>Arthroderma otae</i>	25,12882066	Высокодостоверная идентификация
Штамм HS 09-18			
Bruker MALDI Biotyper Database	<i>Microsporum canis</i>	1,60	Недостоверная идентификация
MSI (Mass Spectrometry Identification platform)	<i>Arthroderma otae</i>	31,35865795	Высокодостоверная идентификация

штаммов *M. canis* из исследования [12] (приведены в скобках) – пики с m/z 6112 (6114) и 6828 (6831). При этом другие пики в масс-спектрах изолятов отличаются.

Заключение

В результате исследования нами были выявлены пики в масс-спектрах, специфические для зоофильного и антропофильного штаммов *M. canis*. Насколько нам известно, подобные различия описаны впервые в литературе. Это косвенно говорит о том, что штаммы дерматофитов отличаются по протеому, и, возможно, спектру секретируемых ферментов, что позволяет им адаптироваться под различные виды биологических хозяев. Разные линии дерматофитов, циркулирующие в природе, могут обладать разной степенью патогенности для человека,

однако данные аспекты должны быть изучены в дальнейших исследованиях.

Как показало настоящее исследование, метод МАЛДИ масс-спектрометрии может быть использован для идентификации дерматофитов, однако достоверные результаты могут быть получены с помощью специализированных микологических баз данных. Также данный метод ограниченно применим для внутривидовой дифференциации дерматофита *M. canis*. Нами обнаружены специфические отличия в масс-спектрах зоофильных и антропофильных штаммов *M. canis*, что может говорить о наличии специализации в отношении организма-хозяина у различных линий внутри одной популяции гриба.

Финансирование. Работа финансирована в рамках государственного задания по научно-исследовательской работе № FGUG-2019-0002.

Литература

- Ginter-Hanselmayer G., Weger W., Ilkit M. et al. Epidemiology of tinea capitis in Europe: Current state and changing patterns. *Mycoses* 2007; 50(2): 6–13.
- Seebacher C., Bouchara J.P., Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 2008; 166(5–6):335–352.
- Pasquetti M., Min A. R. M., Scacchetti S. et al. Infection by *Microsporum canis* in paediatric patients: A veterinary perspective. *Veterinary Sciences* 2017; 4(3): 46.
- Sharma R., De Hoog S., Presber W. et al. A virulent genotype of *Microsporum canis* is responsible for the majority of human infections. *Journal of Medical Microbiology* 2007; 56(10): 1377–1385.
- L'Ollivier C., Ranque S. MALDI-TOF-based dermatophyte identification. *Mycopathologia* 2017; 182(1): 183–192.
- Bartosch T., Frank A., Günther C. et al. Trichophyton benhamiae and T. mentagrophytes target guinea pigs in a mixed small animal stock. *Medical Mycology Case Reports* 2019; 23: 37–42.
- Sauer S., Freiwald A., Maier T. et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PloS one* 2008; 3(7): e2843.
- Афанасьев М. В., Миронова Л. В., Басов Е. А. и соавт. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ в ускоренной идентификации микроорганизмов рода *Vibrio*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 2014; (3): 22–29.
- Normand A. C., Becker P., Gabriel F. et al. Validation of a new web application for identification of fungi by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology* 2017; 55(9): 2661–2670.

10. Hedayati M. T., Ansari S., Ahmadi B. et al. Identification of clinical dermatophyte isolates obtained from Iran by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Current Medical Mycology* 2019; 5(2): 22.

11. Calderaro A., Motta F., Montecchini S. et al. Identification of dermatophyte species after implementation of the in-house

MALDI-TOF MS database. *International Journal of Molecular Sciences* 2014; 15(9): 16012-16024.

12. Hariu M., Watanabe Y., Shimada D. et al. A Household *Microsporum canis* Dermatophytosis Suggested by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry Analysis. *The American Journal of Case Reports* 2021; 22: e930713-1.

Сведения об авторах

Роман Сергеевич Овчинников. ФГБУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Лаборатория микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова. г. Москва, Рязанский проспект, д. 24 к.1. Тел. +7 925 040 9228. Электронная почта rsovchinnikov@mail.ru

Никита Борисович Поляков – Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, научный сотрудник лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов; polyakovnb@gmail.com

Андрей Иванович Соловьев – Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Ph.D., научный сотрудник лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов; dronnias@gmail.com

Алла Габбазовна Гайнуллина – ФГБУ ФНЦ ВИЭВ РАН, младший научный сотрудник лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова; gainullinaalla@gmail.com

В.А. Савинов – ФГБУ ФНЦ ВИЭВ РАН, научный сотрудник лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х. Саркисова; visik06@mail.ru

А.В. Капустин – ФГБУ ФНЦ ВИЭВ РАН, д.б.н., доцент, заместитель директора по научной работе; kapustin_andrei@mail.ru

Алексей Михайлович Гулюкин – ФГБУ ФНЦ ВИЭВ РАН, д.в.н., директор; admin@viev.ru

Статья принимает участие в конкурсе научных публикаций по медицинской микологии, объявленном Академией Микологии в 2021 году