

ВЕТЕРИНАРНА ГІГІЄНА

УДК 619.384.8:576.32

Використання MALDI-TOF мас-спектрометрії у ветеринарній мікології

Тишківська Н.В.¹ , Тишківська А.М.² 

¹Білоцерківський національний аграрний університет

²Національний університет біоресурсів і природокористування України

 Тишківська Н.В., БНАУ, м.Біла Церква, Соборна площа, 8/1. E-mail: anatalya_tyshkivska@ukr.net



Тишківська Н.В., Тишківська А.М. Використання MALDI-TOF мас-спектрометрії у ветеринарній мікології. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2019. № 2. С. 20–28.

Tyshkiv'ska N.V., Tyshkiv'ska A.M. Vykorystannja MALDI-TOF masspektrometrii u veterynarnij mikologii'. Naukovyj visnyk veterynarnoi' medycyny, 2019. № 2. PP. 20–28.

Рукопис отримано: 06.09.2019р.
Прийнято: 05.11.2019р.
Затверджено до друку: 17.12.2019р.

doi: 10.33245/2310-4902-2019-152-2-20-28

Досліджено використання MALDI-TOF мас-спектрометрії для ідентифікації дріжджів та пліснявих грибів у кормах для тварин.

Матеріалом для роботи були зразки кормів для тварин, що надходили для дослідження з різних регіонів України. Наявність дріжджів та пліснявих грибів визначали згідно з ДСТУ ISO 7954:2006. Для встановлення загальної заспореності кормів мікроміцетами проводили первинне виділення грибів із кормів шляхом посіву їх на середовище Сабуро, при цьому застосовували метод серійних розведень для підрахунку вмісту діаспор грибів в 1 г корму. Інкубували досліджені зразки корму за температури 24 °С протягом 5–7 діб. Ідентифікацію пліснявих грибів проводили методом MALDI-TOF.

У процесі мікологічного обстеження кормів протягом 2018–2019 рр. було досліджено 198 зразків для тварин.

За дослідний період найбільшу кількість обстежено комбікормів, що становило 30,4 % у 2018 році, від загальної кількості зразків (19,6 % – комбікорми для птиці, 10,8 % – для свиней). За п'ять місяців 2019 року спостерігаємо таку ж тенденцію: у 31,1 % випадків переважало визначення дріжджів та плісневих грибів у комбікормах, із них 19,8 % припадає на комбікорми для птиці і у 11,3 % випадків – для свиней. На другому місці за кількістю досліджень зразки кукурудзи – 11,9 і 11,3 % у 2018 та 2019 рр. відповідно.

Найбільш поширеними видами грибів у кормах були представники родів *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*.

Належність мікроскопічних грибів до певних родів визначали шляхом оцінювання морфології колонії грибів на середовищах та морфологію конідиносних структур.

Особливу увагу звертали на мікроскопічні гриби родини *Fusarium*, які є продуцентами різних мікотоксинів. За допомогою програмного забезпечення MALDI Biotyper проводили автоматичну ідентифікацію на підставі порівняння зібраних вихідних спектрів гриба із референтними спектрами бази даних самого приладу, а також із бібліотекою Бельгійського університету (BCCM, Belgian Co-Ordinateo collections of micro-organism).

За результатами мас-спектрометрії, мікроскопічні гриби родини *Fusarium* були представлені 9 видами. Із них найчастіше зустрічали 5 видів: *F. proliferatum*, *F. acutatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*. Серед грибів родини *Aspergillus* переважали *A. flavus*, *A. pseudoglaucus*, *A. tubingensis*, *A. niger*.

Проведення видової ідентифікації мікроскопічних грибів за допомогою мас-спектрометрії допомагає швидко та якісно ідентифікувати плісняві гриби і дріжджі. Визначення видової належності мікроскопічних організмів відбувається за рахунок аналізу білкової фракції лізату мікроскопічних грибів та дріжджів ("пряме білкове профілювання"). Програмне забезпечення MALDI Biotyper включає автоматичну ідентифікацію пліснявих грибів на підставі порівняння вихідних спектрів з референтними спектрами бази даних. Ідентифікація мікроорганізмів за допомогою MALDI-TOF MS ґрунтується на оцінці рибосомних білків, які зазвичай наявні у клітині.

Чутливість методу MALDI-TOF MS становить 10³–10⁶ м.к./см³. При цьому точність ідентифікації залежить від кількості досліджуваного матеріалу.

Для визначення ймовірності ідентифікації заданий логарифмічний показник – коефіцієнт відповідності Score, щодо значення якого оцінюють надійність і адекватність результатів. Чим вище коефіцієнт відповідності, тим імовірніше отримання правильного результату ідентифікації.

Технологія MALDI-TOF мас-спектрометричної ідентифікації мікроміцетів характеризується високою швидкістю вимірювання, низькою вартістю використуваних реактивів і матеріалів та простою пробопідготовкою.

Ключові слова: ідентифікація пліснявих грибів, MALDI-TOF, мас-спектрометрія, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Метод мас-спектрометрії широко використовували в наукових дослідженнях десятиліттями, переважно в галузі хімічних наук, але тільки в 1975 р. група авторів [1] вперше висловила припущення, що з використанням цієї технології можна отримувати мас-спектрометричні характеристики бактерій. Вони відзначили, що бактеріальні екстракти різних родів і видів мають унікальні спектри. Поява і розвиток в кінці 1980-х років [2] м'яких іонізуючих технологій, таких як MALDI і електроспрей-іонізації (ESI), уможливили проведення мас-спектрометричного аналізу великих біологічних молекул, зокрема, білків. Holland і співавт. в 1996 р. вперше повідомили про можливість отримання мас-спектрометричних "відбитків пальців" інтактних бактеріальних клітин з використанням MALDI-TOF [3]. З цього часу почалося зростання кількості публікацій з видової ідентифікації бактерій за допомогою цієї технології [4–7].

Здатність MALDI-TOF до швидкої ідентифікації мікроорганізмів дозволяє використовувати цей метод в різних галузях науки і практики: клінічної мікробіологічної діагностики, дослідженнях довкілля, контроль якості фармацевтичних і харчових продуктів. Вкрай важливі ознаки методу – висока продуктивність і низький рівень витрат – роблять його перспективною альтернативою стандартним лабораторним біохімічним і молекулярним ідентифікаційним системам [8, 9].

MALDI-TOF MS (з англ. matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry) – метод матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації з використанням часпролітної мас-спектрометрії, який позиціонується як швидка, надійна і економічно вигідна альтернатива класичного методу ідентифікації [10–16]. Він заснований на екстракції пептидів і білків з клітин гриба та працює за принципом "fingerprint" (молекулярний "відбиток пальця"), що зрівняється з еталонними спектрами в базі MALDI.

MALDI-TOF мас-спектрометр складається з трьох функціональних частин:

1) лазер, під впливом якого відбувається десорбція/іонізація;

2) аналізатор мас, який ділить іони згідно з їх співвідношенням маса/заряд (m/z) за часом прольоту в вакуумі;

3) детектор – пристрій для визначення розділених іонів.

За використання MALDI-аналізу у мікробіології досліджувані зразки культур мікроорганізмів змішують з матрицею, яка володіє оптичною абсорбцією в діапазоні використуваних довжин хвиль [17]. Склад матриці може змінюватися залежно від аналізованих біомолекул і типу використуваного лазера [18]. Найбільш часто використувані матриці – це α -ціано-4-гідроксикорична кислота, яка показала високу ефективність для детекції біомаркерів протеїнів [13–15], і 2,4-гідроксифенілбензойна кислота, має переваги за детекції глікопептидів і глікопротеїнів [19–22].

Процесинг інтактних мікроорганізмів у MALDI-TOF може проходити без попередньої підготовки, оскільки більшість бактерій лізуються після контакту з водою, органічним розчинником і/або сильною кислотою в матриці.

Під час ідентифікації стійких мікроорганізмів, таких як спори бактерій, деякі віруси, клітини дріжджів, з використанням MALDI за підготовчих процедур зазвичай додають сильні органічні кислоти і/або спирт. За дослідження деяких родів бактерій, таких як *Actinomyces*, може бути доцільним проведення попередньої екстракції білка [23].

Отже, MALDI-TOF – автоматизована молекулярна платформа, яка являє собою швидкий, простий і надійний метод видової ідентифікації бактерій та грибів.

Мета дослідження – використання MALDI-TOF мас-спектрометрії для ідентифікації дріжджів та пліснявих грибів у кормах для тварин.

Матеріал та методи дослідження. Матеріалом для роботи були зразки кормів, що надходили для дослідження у експертний центр діагностики та лабораторного супроводу "Біолайтс" з різних областей України протягом

2018–2019 рр. Наявність дріжджів та пліснявих грибів визначали згідно з ДСТУ ISO 7954:2006 [24]. Для встановлення загальної заспореності кормів мікроміцетами проводили первинне виділення грибів із кормів шляхом посіву їх на середовище Сабуро, при цьому застосовували метод серійних розведень для підрахунку вмісту діаспор грибів в 1 г корму. Інкубували досліджені зразки корму за температури 24 °C протягом 5–7 діб. Ідентифікацію пліснявих грибів проводили методом MALDI-TOF мас-спектрометром Bruker MALDI, із використанням рідинного культивування зразків мікроскопічних грибів та екстракцією у етанолово-мурашиній кислоті для приготування зразків.

Із чашки з первинним посівом ізолювали колонії для ідентифікації, з яких готували суспензію в 300 мкл ультрачистої води для ВЕРХ та ретельно перемішували для досягнення максимального гомогенізованої суспензії. Потім в пробірці з препаратами додавали по 900 мкл абсолютного етанолу, перемішували та інкубували за кімнатної температури протягом півгодини. Після експозиції центрифугували 2 хв за 13 000 об/хв, видаляли супернатант, висушували на повітрі. У пробірці вносили по 50 мкл ацетонітрилу і 70 % розчину мурашиної кислоти, знову перемішували і наносили матеріал в обсязі 1 мкл на лунки металевої мішені (чіпа). На кожну пробу наносили по 1 мкл матриці для MALDI-TOF (α -ціано-гідроксикорична кислота в розчині 50 % ацетонітрилу і 2,5 % трихлороцтової кислоти). Після кристалізації проб мішень із зразками поміщали в камеру мас-аналізатора. Для отримання одиночного мас-спектра використовували 100 імпульсів лазера (частота 60 Гц); діапазон реєстрації становив 1000–20000 m/z , фіксували тільки позитивні іони, сумарний спектр кожного зразка складали на основі 100 пострілів. Із кожної лунки чіпа знімали спектр, що являє собою суму 6 одиничних спектрів (600 імпульсів лазера). Усі мас-спектри реєстрували у лнійному режимі, без використання рефлектрона.

Результати досліджень. У процесі мікологічного обстеження кормів протягом 2018–2019 рр. було досліджено 198 зразків для тварин (табл. 1).

Задослідний період найбільшу кількість обстежено комбікормів, що становило 30,4 % у 2018 році, від загальної кількості зразків (19,6 % – комбікорми для птиці, 10,8 % – для свиней). За п'ять місяців 2019 року спостерігаємо таку ж тенденцію: у 31,1 % випадків переважало визначення дріжджів та плісневих грибів у комбікормах, із них 19,8 % припадає на комбікорми для птиці і у 11,3 % випадків –

для свиней. На другому місці за кількістю досліджень зразки кукурудзи – 11,9 та 11,3 % у 2018 та 2019 рр. відповідно.

Таблиця 1 – Кількість досліджених зразків кормів упродовж 2018–2019 років

Корм	Роки	
	2018	2019
Макуха соєва	10	14
Шрот сояшниковий	8	11
Комбікорм ПК	18	21
Комбікорм СК	10	12
Ячмінь	8	6
Кукурудзяний силос	5	7
Люцерновий сінаж	6	8
Кукурудза	11	12
Пшениця	9	7
Ячмінь	7	8
Всього	92	106

Аналізуючи результати мікологічного дослідження слід відмітити, що 95,7 % досліджених зразків були уражені потенційно небезпечними мікроскопічними грибами (рис. 1).

Найбільш поширеними видами грибів у кормах були представники родів *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillum*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*.

Належність мікроскопічних грибів до певних родів визначали шляхом оцінювання морфології колоній грибів на середовищах та морфологію конідієносних структур [25].

Описуючи колонії, спираліся на такі діагностичні ознаки як діаметр колоній, їх колір, форма, консистенція, форма краю колоній, реверзум колоній. Ідентифікацію мікропрепаратів мікроскопічних грибів проводили на основі таких діагностичних ознак як форма апікального розширення, його діаметр, довжина та ширина конідієносця, стеригм, форма конідій.

Особливу увагу звертали на мікроскопічні гриби родини *Fusarium*, адже ряд вчених [26–28] вказують, що представники цього роду є найбільш небезпечними у глобальному масштабі – вони уражають рослини як на стадії вегетації, накопичуючи в їх органах і тканинах фітотоксини, так і грубі корми й зерно під час зберігання. Фузаріоз найчастіше переважає у зерні до збирання врожаю і при цьому можуть продукуватись різні мікотоксини, важливими з яких є трихотецени, фумонізени, зеараленон, моніліформін та фузарієва кислота. Популяція грибів *Fusarium* в сільськогосподарських ґрунтах є дуже розповсюдженою і включає як сапрофіти, що розщеплюють залишки, так і патогенні, які можуть бути причиною хвороб рослин і тварин [29]. Саме тому, важли-

во визначити видову належність грибів роду *Fusarium*, з цією метою застосовували метод мас-спектрометрії MALDI-TOF MS.

Колонії грибів, що виростили на середовищі Сабуро відбирали, екстрагували згідно з методикою та наносили на лунки металевої мішені мас-спектрометра для ідентифікації.

За допомогою програмного забезпечення MALDI Biotyper проводили автоматичну ідентифікаціюна підставі порівняння зібраних вихідних спектрів гриба із референтними спектрами бази даних самого приладу, а також із бібліоте-

кою Бельгійського університету (BCCM, Belgian Co-Ordinateo collections of micro-organism).

За результатами мас-спектрометрії, мікроскопічні гриби родини *Fusarium* були представлені 9 видами. Із них найчастіше зустрічали 5 видів: *F. proliferatum*, *F. acutatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides* (рис. 2).

Виявлені гриби роду *Fusarium* здатні продукувати мікотоксини: *F. proliferatum* – моноформін і фумонізін; *F. acuminatum* – моноформін; *F. subglutinans* – зеараленон і моноформін; *F. verticillioides* – фумонізін. *F. poae* є відносно

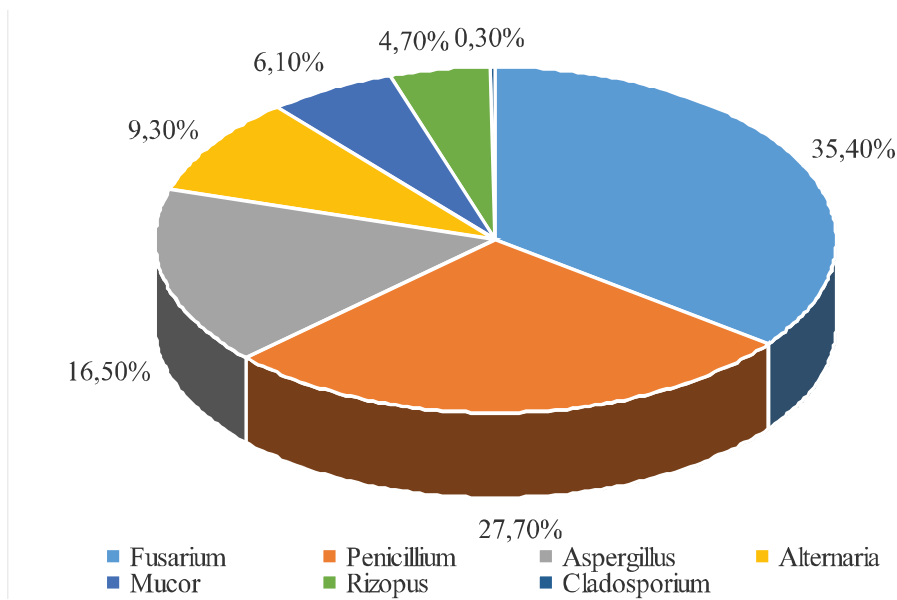


Рис.1. Основні види плісневих грибів, забруднювачів кормів.

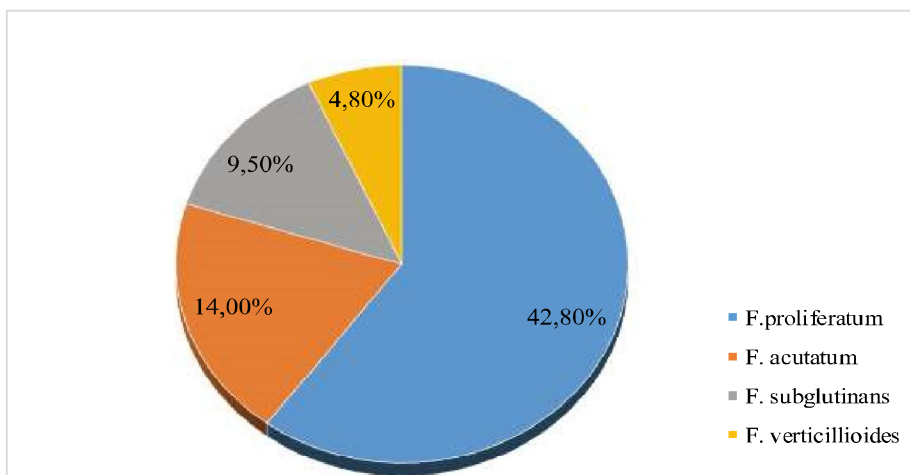


Рис. 2. Видова належність грибів роду *Fusarium*.

слабкими патогенами, але здатні до синтезу токсинів [30].

Саме тому, надзвичайно важливо ідентифікувати гриби за видом застосовуючи надійні методи MALDI TOF мас-спектрометрії.

Значне поширення у досліджених зразках мали гриби родини *Aspergillus*. Серед яких переважали *A. flavus*, *A. pseudoglaucus*, *A. tubingensis*, *A. niger*.

A. niger та *A. pseudoglaucus* за ростом і формою колоній та за мікроскопії дуже схожі між собою. Саме тому, лише за допомогою мас-спектрометрії вдалося ідентифікувати мікроскопічні гриби.

Спори *Aspergillus flavus*, потрапляючи через дихальні шляхи або травний тракт до організму птиці, зумовлюють плісневий мікоз, який характеризується фібринозним вузликовим ураженням органів дихання (повітряних мішків, бронхів, легень) і серозних покривів. Також захворювання птиці можливе в разі проникнення спор і мицелію аспергіл через неушкоджену шкаралупу яйця з подальшим розвитком в білку, жовтку і повітряній камері. У новонароджених курчат захворювання проявляється вже в перші години життя [31].

Тому, сучасний спектр мікологічних досліджень кормів та біологічного матеріалу обов'язково має включати родову та видову ідентифікацію мікроміцетів.

Як єдина система, цей метод дозволяє аналізувати біомолекули (такі як ДНК, білки, пептиди) і великі органічні молекули (такі як полімери). Ці молекули, зазвичай, тендітні і фрагментуються за іонізації більш традиційними методами. Після іонізації, викликаної лазерним променем, система виконує сканування на наявність білків грибів, які в основному потрапляють в діапазон від 4000 до 20000 Дальтон.

Для визначення ймовірності ідентифікації заданий логарифмічний показник – коефіцієнт відповідності Score, щодо значення якого і оцінюють надійність і адекватність результатів. Чим вище коефіцієнт відповідності, тим імовірніше отримання правильного результату ідентифікації.

Дані про результат ідентифікації досліджуваного зразка виводять у вигляді звіту, що включає два найбільш близьких мікроорганізмів і більш детальну інформацію по десяти інших мікроорганізмах, що мають ознаки подібності з мас-спектром досліджуваного зразка.

Достовірність отриманих результатів характеризується значенням від 0 до 3000, а також колірним, символічним і літерним позначенням, представленим у таблиці 2.

Результат ідентифікації мікроорганізмів, що містяться в зразку, записують у журнал мікробіологічного дослідження і/або вносять у

Таблиця 2 – Ступінь достовірності отриманих результатів за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії

№ п/п	Діапазон Score	Опис
1	2000–3000	Висока ймовірність видової ідентифікації
2	1700–1999	Надійна родова ідентифікація, можлива видова ідентифікація
3	0–1700	Ненадійна ідентифікація

Обговорення. Проведення видової ідентифікації мікроскопічних грибів за допомогою мас-спектрометрії допомагає швидко і якісно ідентифікувати плісняві гриби та дріжджі. Визначення видової належності мікроскопічних організмів відбувається за рахунок аналізу білкової фракції лізату мікроскопічних грибів та дріжджів ("пряме білкове профілювання"). Програмне забезпечення MALDI Biotyper включає автоматичну ідентифікацію пліснявих грибів на підставі порівняння вихідних спектрів з референтними спектрами бази даних. Ідентифікація мікроорганізмів за допомогою MALDI-TOF MS ґрунтується на оцінці рибосомних білків, які зазвичай наявні в клітині.

Чутливість методу MALDI-TOF MS становить 10^3 – 10^6 м.к./см³. При цьому точність ідентифікації залежить від кількості досліджуваного матеріалу.

комп'ютерно-інформаційну систему, що зберігає інформацію лабораторних результатів. Звіт також зберігають в базі програмного забезпечення приладу.

Періодичність контролю стабільності вимірювань регламентують у Керівництві по якості лабораторії. Залежно від обраної періодичності, але не рідше 1 разу на місяць, проводять ідентифікацію контрольних тест-штамів мікроорганізмів.

Висновки. Технологія MALDI-TOF мас-спектрометричної ідентифікації мікроміцетів характеризується високою швидкістю вимірювання, низькою вартістю використовуваних реактивів і матеріалів та простою пробопідготовкою.

Відомості про дотримання біоетичних норм. Тварин для дослідження не використовували.

Відомості про конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Корноухова Л.Л. Результативность применения масс-спектрометрии при автоматизации микробиологической диагностики. *Клин. лаб. диагностика*. 2014. № 9. 73 с.
2. Sauer S., Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. Vol. 8. P. 74–82.
3. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology / S.Emonet, et al. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010. Vol. 16. P. 1604–1613.
4. Полищук А.Г. MALDI-TOF масс-спектрометрическая идентификация медицински значимых микромицетов (обзор). *Проблемы медицинской микологии*, 2011. Т.13. №4. С. 8–10.
5. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry / M. Erhard et al. *Exp. Dermatol.* 2008. Vol. 17. P. 356–361.
6. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry / C. Marinach-Patrice et al. *PLoS One*. 2010. Vol. 5. 8862 p.
7. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / A. Ferroni et al. *J. Clin. Microbiol.* 2010. Vol. 48. P. 1542–1548.
8. Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р. Масс-спектрометрия – новое слово в клинической микробиологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016. № 61(12). С. 842–848.
9. Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization Biotyper system / Y. Yan et al. *J. Clin. Microbiol.* 2011. Vol. 49. P. 2528–2532.
10. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species / A. Alanio et al. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011. Vol. 17. P. 750–755.
11. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates / C. Marinach-Patrice et al. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009. Vol. 15. P. 634–642.
12. The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum* / F. Seyfarth et al. *Exp. Dermatol.* 2008. Vol. 17. P. 965–971.
13. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* / I.Quiles-Melero et al. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011. Vol. 12. P. 1364–1385.
14. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry / O. Bader et al. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011. Vol. 17. P. 1359–1365.
15. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi / L.Putignani et al. *Mol. Biosyst.* 2011. Vol. 7. P. 620–629.
16. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species / L. G. Stevenson et al. *J. Clin. Microbiol.* 2010. Vol. 48. P. 3482–3486.
17. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of

clinical yeast isolates / G. Marklein et al. *J. Clin. Microbiol.* 2009. Vol. 47. P. 2912–2917.

18. Van Veen S.Q., Claas E.C.J., Kuijper Ed J. J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Clin. Microbiol.* 2010. Vol. 48. P. 900–907.

19. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis* / S. R. Lockhart et al. *J. Clin. Microbiol.* 2008. Vol. 46. P. 2659–2664.

20. Interaction of bacteria and ion-exchange particles and its potential in separation for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric identification of bacteria in water / Z. Guo et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009. Vol. 23. P. 3983–3993.

21. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of bacteria cultured in liquid media / N. Zhou et al. *Sci. China Life Sci.* 2011. Vol. 54. P. 48–53.

22. *Aspergillus* PCR: One Step Closer to Standardization / P. L. White et al. *J. Clin. Microbiol.* 2010. Vol. 48. P. 1231–1240.

23. Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting / J. M. Hettick et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008. Vol. 22. P. 2555–2560.

24. ДСТУ ISO 7954:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови з підрахунку дріжджів і мікроскопічних грибів. Техніка підрахунку колоній, культивованих за температури 25°C (ISO 7954:1997, IDT). Київ: Держспоживстандарт України, 2008. 5 с.

25. Саттон Д., Фотергил А., Ринальди М. Определи-тель патогенных и условно патогенных грибов. Москва: Мир, 2001. 467 с.

26. Аак О.В. Аллергены грибов, особенности микогенной сенсибилизации (Обзор). *Пробл. мед. микологии*. 2005. Т.7. № 2. С. 12–15.

27. Журавлева Н.П., Бегаева Н.Н., Бабенко Г.А. Естественная изменчивость микромицетов – продуцентов аллергено активных веществ. *Пробл. мед. микологии*. 2001. Т.3. № 2. С. 3–5.

28. Тревор К. Шміт. Современные концепции микотоксинов. Эффективне птахівництво та тваринництво. 2004. № 9. С. 67–73.

29. Ярошенко М.О. Плісеневі сапрофіти – біотичні контаміанти кормів як можливе джерело мікозів сільськогосподарської птиці. *Ветеринарна медицина*. 2016. В. 102. С. 235–240.

30. Марфенина О.Е., Фомичева Г.М. Потенциальные патогенные мицелиальные грибы в среде обитания человека. Современные тенденции. *Микология сегодня* / под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. Москва: Национальная академия микологии, 2007. Т. 1. С. 235–266.

31. A dark strain in the *Fusarium solani* species complex isolated from primary subcutaneous sporotrichoid lesions associated with traumatic inoculation via a rose bush thorn / A.S. Kantarcioglu et al. *Med. Mycol.* 2009. Vol. 30. P. 1–7.

REFERENCES

1. Kornoukhova, L.L. (2014). Rezultatyvnost pryumenenya mass-spektrometryu pry avtomatyatsyyu mykrobiologicheskoi dyahnostyky [The effectiveness of mass spectrometry in

the automation of microbiological diagnostics]. *Klyn. lab. Dyagnostyka* [Wedge. lab. diagnostics]. no. 9, pp. 73–73.

2. Sauer, S., Kliem, M. (2010). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* Vol. 8, pp. 74–82.

3. Emonet, S., Shah, H.N., Cherkaoui, L.A. (2010). Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* Vol. 16, pp. 1604–1613.

4. Polyshchuk, A.H. (2011). MALDI-TOF masspektrometricheskaja identifikacija medicinski znachimyh mikromicetov (obzor) [MALDI-TOF mass spectrometric identification of medically significant micromycetes (review)]. *Problemy medicinskoj mikologii* [Problems of Medical Mycology]. Vol. 13, no. 4, pp. 8–11.

5. Erhard, M., Hipler, U.C., Burmester, A. (2008). Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Exp. Dermatol.* Vol. 17, pp. 356–361.

6. Marinach-Patrice, C., Fekkar, A., Atanasova, R. (2010). Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS One.* Vol. 5, 8862 p.

7. Ferroni, A., Suarez, S., Beretti, J.L. (2010). Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 48, pp. 1542–1548.

8. Pryputnevych, T.V., Melkumian, A.R. (2016). Masspektrometryia – novoe slovo v klynicheskoi mykrobiolohyy [Mass spectrometry is a new word in clinical microbiology]. *Klynicheskaja laboratornaia dyagnostyka* [Clinical Laboratory Diagnostics]. no. 61(12), pp. 842–848.

9. Yan, Y., He, Y., Maier, T. (2011). Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption/ionization Biotyper system. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 49, pp. 2528–2532.

10. Alanio, A., Beretti, J.L., Dauphin, B. (2011). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin. Microbiol. Infect.* Vol. 17, pp. 750–755.

11. Marinach-Patrice, C., Lethuillier, A., Marly, A. (2009). Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* Vol. 15, pp. 634–642.

12. Seyfarth, F., Ziemer, M., Sayer, H.G. (2008). The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. *Exp. Dermatol.* Vol. 17, pp. 965–971.

13. Quiles-Melero, I., Garcia-Rodriguez, J., Gomez-Lopez, A. (2011). Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Vol. 12, pp. 1364–1385.

14. Bader, O., Weig, M., Taverne-Ghadwal, L. (2011). Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* Vol. 17, pp. 1359–1365.

15. Putignani, L., Del Chierico, F., Onori, M. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Mol. Biosyst.* Vol. 7, pp. 620–629.

16. Stevenson, L.G., Drake, S.K., Shea, Y.R. (2010). Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 48, pp. 3482–3486.

17. Marklein, G., Josten, M., Klanke, U. (2009). Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 47, pp. 2912–2917.

18. Van Veen, S.Q., Claas, E.C.J., Kuijper, Ed J. J. (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Clin. Microbiol.* Vol. 48, pp. 900–907.

19. Lockhart, S.R., Messer, S.A., Pfaller, M.A. (2008). Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 46, pp. 2659–2664.

20. Guo, Z., Liu, Y., Li, S. (2009). Interaction of bacteria and ion-exchange particles and its potential in separation for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric identification of bacteria in water. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* Vol. 23, pp. 3983–3993.

21. Zhou, N., Wang, N., Xu, B. (2011). Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of bacteria cultured in liquid media. *Sci. China Life Sci.* Vol. 54, pp. 48–53.

22. White, P.L., Bretagne, S., Klingspor, L. (2010). *Aspergillus* PCR: One Step Closer to Standardization. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 48, pp. 1231–1240.

23. Hettick, J.M., Green, B.J., Buskirk, A.D. (2008). Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* Vol. 22, pp. 2555–2560.

24. DSTU ISO 7954:2006. Mikrobiolohiia kharchovykh produktiv i kormiv dlia tvaryn. Zahalni nastanovy z pidrakhunku drizhdzhiv i mikroskopichnykh hrybiv. Tekhnika pidrakhunku kolonii, kultyvovanykh za temperatury 25°C (ISO 7954:1997, IDT) [DSTU ISO 7954: 2006 Microbiology of food and animal feed. General guidelines for counting yeast and microscopic fungi. Technique for counting colonies cultured at 25°C (ISO 7954: 1997, IDT)]. Kyiv: State Consumer Standard of Ukraine Publ., 2008. 5 p.

25. Satton, D., Foterhyll, A., Rynaldy, M. (2001). *Opredelitel' patogennyh i uslovno patogennyh gribov* [Determinant of pathogenic and conditionally pathogenic fungi]. Moscow: World, 486 p.

26. Aak, O.V. (2005). Allergeny gribov, osobennosti mikogennoj sensibilizacii (Obzor) [Fungus allergens, especially mycogenic sensitization (Review)]. *Probl. med. Mikologii* [Problems honey. mycology]. Vol. 7, no. 2, pp. 12–15.

27. Zhuravleva, N.P., Begaeva, N.N., Babenko, G.A. (2001). Estestvennaja izmenchivost' mikromicetov – producentov allergeno aktivnih veshhestv [The natural variability of micromycetes - producers of allergenic active substances]. *Probl. med. Mikologii* [Problems honey. Mycology]. Vol. 3, no. 2, pp. 3–5.

28. Trevor, K. Shmit. (2004). *Sovremennye koncepcii miktoksikozov* [Modern concepts of mycotoxicosis].

Efektivne ptahivnictvo ta tvarinnictvo [Effective poultry and livestock]. no. 9, pp. 67–73.

29. Jaroshenko, M.O. (2016). Plisenevi saprofiti – biotichni kontaminanti kormiv jak mozhlive dzherelo mikoziv sil'skogospodars'koї ptici [Mold saprophytes - biotic contaminants of forage as a possible source of mycosis of farm poultry]. Veterinarna medicina [Veterinary medicine]. Issue 102, pp. 235–240.

30. Marfenina, O.E., Fomicheva, G.M. (2007). Potencial'nye patogennye micelial'nye griby v srede obitanija cheloveka [Potential pathogenic mycelial fungi in the human environment]. Sovremennye tendencii [Modern tendencies]. Mikologija segodnja / pod red. Ju.T. D'jakova, Ju.V. Sergeeva [Mycology Today / Ed. Yu.T. Dyakova, Yu.V. Sergeeva]. Moscow: National Academy of Mycology, Vol. 1, pp. 235–266.

31. Kantarcioglu, A.S., Summerbell, R.C., Sutton, D.A. (2009). A dark strain in the *Fusarium solani* species complex isolated from primary subcutaneous sporotrichoid lesions associated with traumatic inoculation via a rose bush thorn. Med. Mycol. Vol. 30, pp. 1–7.

Использование Maldi-TOF масс-спектрометрии в ветеринарной микологии

Тышківська Н.В., Тышківська А.М.

Исследовано использование MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации дрожжей и плесневых грибов в кормах для животных.

Материалом для работы были образцы кормов для животных, поступавшие для исследования из разных регионов Украины. Наличие дрожжей и плесневых грибов определяли согласно ДСТУ ISO 7954: 2006. Для установления общей засоренности кормов микромицетами проводили первичное выделение грибов с кормов путем посева их на среду Сабуро, при этом применяли метод серийных разведений для подсчета содержания диаспор грибов в 1 г корма. Инкубировали исследованные образцы корма за температуры 24 ° C в течение 5–7 суток. Идентификацию плесневых грибов проводили методом MALDI-TOF.

В процессе микологического обследования кормов в течение 2018–2019 гг. было исследовано 198 образцов кормов для животных.

За исследовательский период наибольшее количество обследовано комбикормов, что составляло 30,4 % в 2018 году, от общего количества образцов (19,6 % – комбикорма для птицы, 10,8 % – для свиней). За пять месяцев 2019 г. наблюдаем ту же тенденцию: в 31,1 % случаев преобладало определение дрожжей и плесневых грибов в комбикормах, из них 19,8 % приходится на комбикорма для птицы и в 11,3 % случаев – для свиней. На втором месте по количеству исследований образцы кукурузы – 11,9 и 11,3 % в 2018 и 2019 соответственно.

Наиболее распространенными видами грибов в кормах были представители родов *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*.

Принадлежность микроскопических грибов к определенным родам определяли путем оценки морфологии колонии грибов на средах и морфологию конидиеносных структур.

Особое внимание обращали на микроскопические грибы семейства *Fusarium*, которые являются продуцентами различных микотоксинов. С помощью программно-

го обеспечения MALDI Biotyper проводили автоматическую идентификацию на основании сравнения собранных исходных спектров гриба с референтными спектрами базы данных самого прибора, а также с библиотекой Бельгийского университета (BCCM, Belgian Co-Ordinateo collections of micro-organism).

За результатами масс-спектрометрии, микроскопические грибы семейства *Fusarium* были представлены 9 видами. Из них чаще всего встречали 5 видов: *F. proliferatum*, *F. acutatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*. Среди грибов семьи *Aspergillus* преобладали *A. flavus*, *A. pseudoglaucus*, *A. tubingensis*, *A. niger*.

Проведение видовой идентификации микроскопических грибов с помощью масс-спектрометрии помогает быстро и качественно идентифицировать плесневые грибы и дрожжи. Определение видовой принадлежности микроскопических организмов происходит за счет анализа белковой фракции лизата микроскопических грибов и дрожжей ("прямое белковое профилирование"). Программное обеспечение MALDI Biotyper включает автоматическую идентификацию плесневых грибов на основании сравнения выходных спектров с референтными спектрами базы данных. Идентификация микроорганизмов с помощью MALDI-TOF MS основывается на оценке рибосомальных белков, которые обычно присутствуют в клетке.

Чувствительность метода MALDI-TOF MS составляет 10^3 – 10^6 м.к./см³. При этом точность идентификации зависит от количества исследуемого материала.

Для определения вероятности идентификации заданный логарифмический показатель – коэффициент соответствия Score, по значению которого и оценивают надежность и адекватность результатов. Чем выше коэффициент соответствия, тем вероятнее получение правильного результата идентификации.

Технология MALDI-TOF масс-спектрометрической идентификации микромицетов характеризуется высокой скоростью измерения, низкой стоимостью используемых реактивов и материалов и простой пробоподготовкой.

MALDI-TOF MC имеет высокую диагностическую чувствительность.

Ключевые слова: идентификация плесневых грибов, MALDI-TOF, масс-спектрометрия, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*.

Use of Maldi-TOF mass spectrometry in veterinary mycology

Tyshkivskaya N., Tyshkivskaya A.

Use of MALDI-TOF mass spectrometry to identify yeast and molds in animal feed.

The material for the work was animal feed samples received for research from different regions of Ukraine. The presence of yeast and molds was determined according to DSTU ISO 7954:2006. To establish the general contamination of the feed with micromycetes, the fungi were first isolated from the feed by planting them on Saburo medium, and the serial dilution method was used to calculate the content of fungi diaspores in 1 g of feed. The feed samples were incubated and studied at a temperature of 24 ° C for 5–7 days. The identification of molds was carried out using the MALDI-TOF method.

In the process of mycological examination of feed during 2018–2019, 198 animal feed samples were examined.

During the study period, the largest number of feed was examined, which was 30.4% in 2018, of the total number of samples (19.6% - feed for poultry, 10.8% - for pigs). For five months of 2019, we observed the same trend: in 31.1% of cases, the definitions of yeast and molds in compound feeds prevailed, of which 19.8% accounted for compound feeds for poultry and in 11.3% of cases for pigs. In second place in the number of studies, corn samples are 11.9 and 11.3% in 2018 and 2019, respectively.

The most common types of fungi in the feed were representatives of the genera *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*.

The affiliation of microscopic fungi to specific genera was determined by assessing the morphology of the fungal colony on media and the morphology of conidiophore structures

Particular attention was paid to microscopic fungi of the *Fusarium* family, which are producers of various mycotoxins. Using the MALDI Biotyper software, automatic identification was performed based on a comparison of the collected initial spectra of the fungus with the reference spectra of the database of the instrument itself, as well as with the library of the University of Belgium (BCCM, Belgian Co-Ordinateo collections of micro-organism).

Following the results of mass spectrometry, microscopic fungi of the *Fusarium* family were represented by 9 species. Of these, 5 species were most often found: *F. proliferatum*,

F. acutatum, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*. Among the fungi of the *Aspergillus* family, *A. flavus*, *A. pseudoglaucus*, *A. tubingensis*, and *A. niger* predominated.

Species identification of microscopic fungi using mass spectrometry helps quickly and accurately identify mold fungi and yeast. Determination of the species affiliation of microscopic organisms occurs through analysis of the protein fraction of the lysate of microscopic fungi and yeast ("direct protein profiling"). MALDI Biotyper software includes automatic identification of molds based on a comparison of the output spectra with the reference spectra of the database. Identification of microorganisms using MALDI-TOF MS is based on the assessment of ribosomal proteins that are usually present in the cell.

The sensitivity of the MALDI-TOF MS method is 103-106 m.k./cm³. In this case, the accuracy of identification depends on the amount of test material.

To determine the likelihood of identification, a given logarithmic indicator is the compliance coefficient Score, the value of which is used to evaluate the reliability and adequacy of the results. The higher the match rate, the more likely it is to get the correct identification result.

MALDI-TOF technology for mass spectrometric identification of micromycetes has a high measurement speed, low cost of reagents and materials used, and simple preparation holes.

MALDI-TOF MS has a high diagnostic sensitivity.

Key words: mold identification, MALDI-TOF, mass spectrometry, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*.



Copyright: © Tyshkivskaya N., Tyshkivskaya A. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



Тишківська Н.В.
Тишківська А.М.

ID <https://orcid.org/0000-0003-4937-1390>
ID <https://orcid.org/0000-0003-4419-2174>