

Received: 03 May 2022 / Accepted: 25 September 2022 / Published online: 31 October 2022

DOI 10.34689/SH.2022.24.5.005

UDC 616.9:578.834.1-084-071

ПРИМЕНЕНИЕ MALDI-MS МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ SARS-COV-2 В НАЗОФАРИНГИАЛЬНЫХ МАЗКАХ. СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.

**Ирина А. Кадырова¹, Айдана А. Султанбекова^{1,2},
Валентина И. Барханская¹, Светлана И. Колесниченко¹,
Евгения А. Колесникова¹, Алена В. Лавриненко¹,
Илья В. Коршуков¹, Ернур К. Беков²,
Сергей В. Егоров³, Дмитрий Б. Бабенко¹**

¹ Научно-исследовательский Центр, г. Караганда, Республика Казахстан;

² НАО «Медицинский университет Караганды», г. Караганда, Республика Казахстан;

³ Университет МакМастер, г. Гамильтон, Канада.

Резюме

Актуальность. Глобальное распространение COVID-19, которое унесло миллионы жизней, показало серьезные проблемы в различных сферах здравоохранения большинства стран, включая Казахстан. Одной из главных задач в борьбе с пандемией стал выбор метода диагностики COVID-19. Метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) был признан золотым стандартом выявления вируса. Однако, проведенные исследования продемонстрировали эффективность применения метода матричной лазерной десорбции / ионизационной масс-спектрометрии (MALDI-MS) и анализа машинного обучения для обнаружения SARS-CoV-2 в назальных мазках.

Цель. Анализ литературы по вопросу использования MALDI-MS масс-спектрометрии для детекции SARS-CoV-2 в назальных мазках человека.

Стратегия поиска. Был сделан анализ полнотекстовых публикаций на английском языке за период 2019-2021 года, в базах данных Medline, Scopus. Запрашивались следующие ключевые слова и их комбинации: SARS-CoV-2 and MALDI and "mass spectrometry" and ms. Было идентифицировано 47 статей, из них 37 включены в исследование для изучения. *Критерии включения:* анализу и обработке подвергались статьи на английском языке за последние 3 года (2019-2021гг), описывающие опыт применения масс-спектрометрии MALDI-TOF MS для детекции SARS-CoV-2 в назальных мазках. *Критерии исключения:* статьи, не описывающие метод MALDI-MS или биоматериал отличный от назального мазка.

Результаты и выводы. Исходя из результатов изученной литературы, использование масс-спектрометрии возможно в качестве альтернативного метода ОТ-ПЦР.

Ключевые слова: COVID-19; масс-спектрометрия; ОТ-ПЦР; SARS-CoV-2; MALDI-TOF; скрининг.

Abstract

APPLICATION OF MALDI-MS MASS SPECTROMETRY FOR THE DETECTION OF SARS-COV-2 IN NASOPHARYNGEAL SWABS. SYSTEMATIC REVIEW

**Irina A. Kadyrova¹, Aidana A. Sultanbekova^{1,2},
Valentina I. Barkhanskaya¹, Svetlana I. Kolesnichenko¹,
Yevgeniya A. Kolesnikova¹, Alyena V. Lavrinenko¹,
Iliya V. Korshukov¹, Yernur K. Bekov²,
Sergei V. Yegorov³, Dmitriy B. Babenko¹**

¹ Research Center, Karaganda, The Republic of Kazakhstan;

² Medical University of Karaganda, Karaganda, The Republic of Kazakhstan;

³ McMaster University, Hamilton, Canada.

Relevance. The global spread of COVID-19, which has claimed millions of lives, has shown serious problems in various areas of healthcare in most countries, including Kazakhstan. One of the main tasks in the fight against the pandemic was to choose an appropriate method for diagnosing COVID-19. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) has been recognized as the gold standard for virus detection. However, studies have demonstrated the effectiveness of matrix laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and machine learning analysis to detect SARS-CoV-2 in nasal swabs.

Aim. Analysis of the literature on the use of MALDI-MS mass spectrometry for the detection of SARS-CoV-2 in human nasal swabs.

Search strategy. An analysis was made of full-text publications in English for the period 2019-2021, in the Medline, Scopus databases. The following keywords and their combinations were requested: SARS-CoV-2 and MALDI and "mass spectrometry" and ms. Forty-seven articles were identified, of which 37 were included in the study for review. Inclusion criteria: Articles in English for the last 3 years (2019-2021) describing the experience of using MALDI-TOF MS mass spectrometry for the detection of SARS-CoV-2 in nasal swabs were analyzed and processed. Exclusion Criteria: Articles that do not describe the MALDI-MS method or a biomaterial other than a nasal swab.

Results and conclusions. Based on the results of the studied literature, the use of mass spectrometry is possible as an alternative method of RT-PCR.

Key words: COVID-19; mass spectrometry; RT-PCR; SARS-CoV-2; MALDI-TOF; screening.

Түйіндеме

SARS-COV-2-НІ МҰРЫН-ЖҰТҚЫНШАҚ ЖАҒЫНДЫЛАРЫНДА АНЫҚТАУ ҮШІН MALDI-MS МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯСЫН ҚОЛДАНУ. ЖҮЙЕЛІ ШОЛУ.

**Ирина А. Кадырова¹, Айдана А. Султанбекова^{1,2},
Валентина И. Барханская¹, Светлана И. Колесниченко¹,
Евгения А. Колесникова¹, Алена В. Лавриненко¹,
Илья В. Коршуков¹, Ернур К. Беков²,
Сергей В. Егоров³, Дмитрий Б. Бабенко¹**

¹ Ғылыми орталық, Қарағанды қ., Қазақстан Республикасы;

² Қарағанды медицина университеті, Қарағанды қ., Қазақстан Республикасы;

³ Макмастер университеті, Гамильтон қ., Канада.

Өзектілігі: Миллиондаған адамның өмірін қиған COVID-19-дың жаһандық таралуы көптеген елдерде, соның ішінде Қазақстанда да денсаулық сақтау жүйесінің әртүрлі салаларында күрделі проблемаларды көрсетті. Пандемияға қарсы күрестің негізгі міндеттерінің бірі COVID-19 диагностикасының әдісін таңдау болды. Кері транскрипция-ПТР (RT-PCR) вирусты анықтаудың алтын стандарты ретінде таңдалды. Дегенмен, жасалған зерттеулер мұрын жағындыларында SARS-CoV-2 анықтау үшін матрицалық лазерлік десорбция/ионизация масс-спектрометриясының (MALDI-MS) және машиналық оқыту талдауының тиімділігін көрсетті.

Мақсат. Адамның мұрын жағындыларында SARS-CoV-2 анықтау үшін MALDI-MS масс-спектрометриясын қолдану бойынша әдебиеттерді талдау.

Іздеу стратегиясы. 2019-2021 жылдар аралығында Medline, Scopus дерекқорларда ағылшын тіліндегі толық мәтінді жарияланымдарға талдау жасалды. Келесі кілт сөздер мен олардың комбинациялары сұралды: SARS-CoV-2 және MALDI және "масс-спектрометрия" және ms. 47 мақала анықталды, оның 37-сі зерттеуге шолу үшін енгізілді. Қосылу критерийлері: мұрын жағындыларында SARS-CoV-2 анықтау үшін MALDI-TOF MS масс-спектрометриясын пайдалану тәжірибесін сипаттайтын соңғы 3 жылдағы (2019-2021) ағылшын тіліндегі мақалалар талданды және өңделді. Алып тастау критерийлері: MALDI-MS әдісін немесе мұрын жағындысынан басқа биоматериалды сипаттамайтын мақалалар.

Нәтижелер мен қорытындылар. Зерттелген әдебиеттердің нәтижелері бойынша RT-ПТР балама әдісі ретінде масс-спектрометрияны қолдану мүмкін.

Түйінді сөздер: COVID-19; масс-спектрометрия; RT-ПТР; SARS-CoV2; MALDI-TOF; скрининг.

Библиографическая ссылка:

Кадырова И.А., Султанбекова А.А., Барханская В.И., Колесниченко С.И., Колесникова Е.А., Лавриненко А.В., Коршуков И.В., Беков Е.К., Егоров С.В., Бабенко Д.Б. Применение MALDI-MS масс-спектрометрии для детекции SARS-CoV-2 в назофарингиальных мазках. Систематический обзор // Наука и Здоровоохранение. 2022. 5(Т.24). С. 36-44. doi 10.34689/SH.2022.24.5.005

Kadyrova I.A., Sultanbekova A.A., Barkhanskaya V.I., Kolesnichenko S.I., Kolesnikova E.A., Lavrynenko A.V., Korshukov I.V., Bekov Ye.K., Yegorov S.V., Babenko D.B. Application of MALDI-MS mass spectrometry for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swabs. Systematic review // Nauka i Zdravookhranenie [Science & Healthcare]. 2022, (Vol.24) 5, pp. 36-44. doi 10.34689/SH.2022.24.5.005

Кадырова И.А., Султанбекова А.А., Барханская В.И., Колесниченко С.И., Колесникова Е.А., Лавриненко А.В., Коршуков И.В., Беков Е.К., Егоров С.В., Бабенко Д.Б. SARS-CoV-2-ні мұрын-жұтқыншақ жағындыларында анықтау үшін MALDI-MS масс-спектрометриясын қолдану. Жүйелі шолу // Ғылым және Денсаулық сақтау. 2022. 5 (Т.24). Б. 36-44. doi 10.34689/SH.2022.24.5.005

Введение

Объявленная ВОЗ 11 марта 2020 года пандемия коронавирусной инфекции повлияла на жизни миллионов людей по всему миру, как когда-то это сделали пандемии оспы, холеры, чумы, «испанки». Причиной вспышки «вирусной пневмонии» 31 декабря в городе Ухань, Китай стал ранее неизвестный штамм коронавируса, получивший после изучения название вирус острого респираторного синдрома 2-го типа (SARS-CoV-2) [32]. Вирус относится к роду *Betacoronavirus*, которые состоят из коронообразной, оболочечной одноцепочечной РНК. Структура вируса имеет нуклеокапсидный белок, который покрывает геномную РНК, образуя спиральный нуклеокапсид (N). Мембранные белки (M) расположены во внутриклеточной мембранной структуре и связываются с внутренними нуклеопротеинами, образуя структуру ядра. Оболочка вируса образована из оболочечного белка (E), мембранного белка и спайк-белка (S), который выступает из оболочки вируса [17, 20]. Эти структуры необходимы при обнаружении вируса при том или ином методе лабораторной диагностики.

На апрель 2022 года по данным Университета Джона Хопкинса в мире более 508 миллионов подтвержденных случаев заболевания коронавирусной инфекцией, из них около 6 миллионов завершились смертельным исходом [18]. В Казахстане за аналогичный период 2022 года согласно официальной статистике, число заболевших КВИ, подтвержденное ПЦР тестом, составляет 1 305 440 и 88 875 заболевших, имеющих отрицательный ПЦР статус. Количество смертельных исходов составило 13 660 случаев [33].

Общество не в первый раз борется с коронавирусной инфекцией. Ранее были вспышки SARS-CoV-1 в 2003 году, MERS-CoV в 2012 году, пандемия SARS-CoV-2 в 2019 году третья. Важным элементом в борьбе с вирусом является его обнаружение, соответственно, лабораторная служба несет колоссальную ответственность.

В начале пандемии были трудности с выбором адекватного метода обнаружения SARS-CoV-2, обладающего высокой специфичностью и чувствительностью, а также экономически выгодного. Молниеносное распространение COVID-19 по всему миру выявило серьезные пробелы в функционировании систем здравоохранения большинства стран. Многие лабораторные службы, в том числе и лаборатории Казахстана, подверглись коллапсу из-за наплыва диагностируемого материала, отсутствия достаточной аппаратной базы и необходимых реагентов.

В 2022 году клиничко-лабораторная диагностика располагает большим спектром диагностических методов для детекции элементов вируса SARS-CoV-2, или же определения косвенных признаков его присутствия в организме [5, 15, 17].

"Золотым стандартом" диагностики коронавирусной инфекции на данный момент является обнаружение вирусной РНК в биоматериале методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). ОТ-ПЦР является высокоточным методом, однако, применение этого метода диагностики требует больших финансовых и временных затрат [14].

Особую актуальность приобрели серологические тесты. Определение антител IgG, IgA, IgM к различным структурным элементам вирусной частицы SARS-CoV-2 (нуклеокапсид, RBD, Spike-protein) применяется для диагностики поствакцинального иммунитета, а также стадийности течения иммунной реакции после контакта с инфекционным агентом [12]. Минусами данной диагностической стратегии являются: невозможность установления инфицирования в первые дни заболевания, отсутствие детекции патогена, перекрестная реактивность, приводящая к ложноположительным результатам.

Метод нейтрализации является чувствительным и высокоспецифичным. Данный метод используется для определения антител, которые напрямую участвуют в нейтрализации вируса и предотвращении клеточной инфекции. Вместе с тем, метод нейтрализации весьма сложен в исполнении, трудоемок и требует определенных технических условий для проведения анализа [5].

Метод выделения вирусной культуры для постановки диагноза нецелесообразен, поскольку для проявления очевидных цитопатических эффектов SARS-CoV-2 в клеточных линиях требуется не менее 3 дней [35]. Более того, техническая оснащенность лаборатории должна соответствовать третьему уровню биобезопасности, очевидно, что большинство медицинских учреждений не располагают подобными помещениями.

Представлены методы детекции SARS-CoV-2, основанные на применении сенсоров: двухфункциональный плазмонный биосенсор, сочетающий плазмонный фототермический (PPT) эффект и локализованный поверхностный плазмонный резонанс (LSPR), датчик на основе полевого транзистора (FET) [24]. Однако, вышеперечисленные методы пока не используются широко в диагностических целях.

Компьютерная томография (КТ) грудной клетки - это обычная неинвазивная технология визуализации с высокой точностью и скоростью. Сообщается, что чувствительность к обнаружению SARS-CoV-2 с помощью компьютерной томографии грудной клетки выше, чем чувствительность полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени. Имеющиеся данные показали, что бессимптомные пациенты с COVID-19 могут показывать парадигматические изменения КТ очень рано и даже до положительного результата с помощью ОТ-ПЦР. Следовательно, есть необходимость проводить КТ, несмотря на отрицательные результаты теста ПЦР. [1, 11, 34, 36].

Даже если существует значительный прогресс в разработке и применении современных методов диагностики, детекция SARS-CoV-2 остается важнейшей проблемой для эпидемиологической службы, клинических врачей, населения, т.к. исход заболевания напрямую зависит от своевременной диагностики и лечения.

Исследователи, заинтересованные в вопросе возможностей MALDI-MS [10, 23, 25, 26, 29, 31], демонстрируют положительные результаты применения

матричной лазерной десорбции / ионизационной масс-спектрометрии (MALDI-MS) и анализа машинного обучения для обнаружения SARS-CoV-2 в назальных мазках. Метод MALDI-TOF базируется на процессе ионизации исследуемого материала посредством воздействия лазерного излучения в присутствии матрицы. Преимуществами предлагаемого метода являются отсутствие предварительной пробоподготовки биоматериала, отсутствие необходимости использования дорогостоящих реагентов, а также доступность оборудования, которое рутинно используется в клинично-диагностических лабораториях. Соответственно, предлагаемый метод обнаружения SARS-CoV-2 в материале, полученном из назального мазка, станет более доступным и менее времязатратным тестом, чем ОТ-ПЦР.

Таким образом, **целью** данной статьи является анализ литературы по вопросу использования MALDI-MS масс-спектрометрии для детекции SARS-CoV-2 в назальных мазках человека.

Стратегия поиска. Анализ и обработке подвергались статьи на английском языке за последние 3 года (2019-2021гг), описывающие опыт применения масс-спектрометрии для детекции SARS-CoV-2 в назофарингиальных и назальных мазках.

Написание систематического обзорного исследования литературы осуществлялось согласно требованиям Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. Поиск проводился в базах данных Medline, Scopus. Запрашивались следующие ключевые слова и их комбинации: SARS-CoV-2 and MALDI and “mass spectrometry” and ms. Было идентифицировано 47 статей, из них 37 включены в исследование. Из полученных результатов поиска 3 статьи явились обзорными: Mass Spectrometry for COVID-19 [27], Mass Spectrometry Techniques in Emerging Pathogens Studies: COVID-19 Perspectives [21], COVID-19, Chikungunya, Dengue and Zika Diseases: An Analytical Platform Based on MALDI-TOF MS, IR Spectroscopy and RT-qPCR for Accurate Diagnosis and Accelerate Epidemics Control [8]. Интересующая методика MALDI-MS описана в большинстве работ, однако, в 2 работах применялась другая методика масс-спектрометрии: десорбционно-ионизационная масс-спектрометрия с самособирающимся монослоем [15], масс-спектрометрия с использованием тяжелых изотопов [7].

Дизайн отбора статей представлен в следующей схеме (Рис. 1).

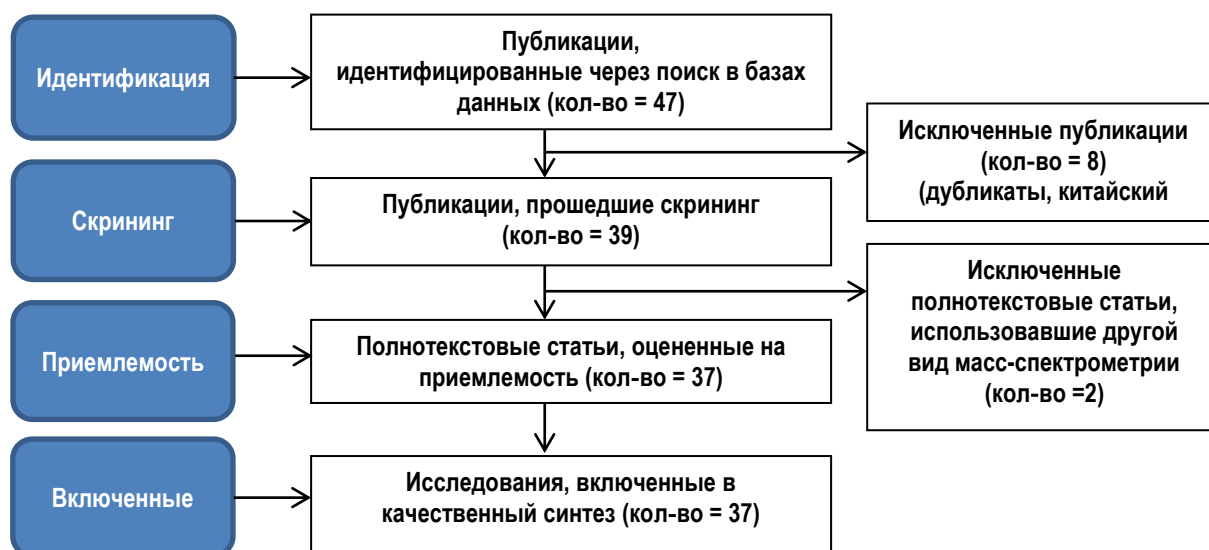


Рисунок 1. Дизайн отбора статей.
(Figure 1. Article selection design).

Результаты и обсуждение

Времяпролетная MALDI-TOF масс-спектрометрия представляет собой уникальный высокоэффективный, точный и вместе с тем низкзатратный метод по сравнению с ОТ-ПЦР. MALDI-TOF масс-спектрометр состоит из трех функциональных частей: лазера, анализатора масс и детектора. Процесс десорбции/ионизации происходит под действием лазера, затем анализатор масс делит ионы по времени их полета в вакууме из соотношения масса/заряд, и наконец, детектор определяет разделение ионов [8, 2]. Матричная лазерная десорбционно-ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия может обнаруживать следы органических молекул в

концентрациях от фемтомолярного до атомолярного уровня (моль/л) и способна устанавливать липиды и белки, выраженные в анализе инфекционного образца, что аналогично «отпечатку пальца» [28, 8]. Метод широко используется для идентификации бактерий, грибов, насекомых, однако, для определения вирусов метод не так распространён. Хотя очевидные достоинства демонстрируются авторами, в том числе и для идентификации SARS-CoV-2.

В качестве человеческого биоматериала для работы с масс-спектрометрией используются назофарингиальные мазки, кровь, слюна, а также мокрота и бронхолегочные смывы. Больше предпочтение отдается мазкам из носоглотки.

Применение MALDI-TOF MS для детекции SARS-CoV-2 в назофарингиальных мазках.

Образцы носоглоточного мазка наиболее часто применялись для исследования возможностей масс-спектрометрии, как для разработки метода альтернативного ПЦР тесту при выявлении вируса, так и в дополнение ПЦР тесту. Выбор носоглоточного мазка обусловлен тем, что эталонный метод, ПЦР, проводится на мазках, соответственно более точное сравнение возможно при схожем биоматериале. Несколько работ оценивали MALDI-TOF в качестве скринингового метода определения SARS-CoV-2. При

некоторой схожести протокола имеются и отличия. Одна группа авторов выбрала в качестве матрицы синапиновую кислоту [10], другие предпочли α -циано-4-гидроксикоричную [23, 25, 29]. Транспортная среда для образцов также отличается: солевая транспортная среда [25, 29], среда *Cary Blair* [23] и среды DeltaSwab ViCUM и DeltaSwab Virus [10]. Авторы выделяют следующие алгоритмы машинного обучения как наиболее применимые для определения вируса: k-NN [25], SVM [23, 10], DNN и GBM [29]. Ожидается в разных работах показатели точности, чувствительности и специфичности отличны (таблица 1).

Таблица 1.

Показатели, полученные разными группами исследователей после масс-спектрометрии и машинным обучением с использованием назофарингиальных мазков.

Table 1. Scores obtained by different research groups after mass spectrometry and machine learning using nasopharyngeal swabs.

	M. F. Rocca et. al	F.M. Nachtigall et. al	N.K. Tran et. al	M. Deulofeu et. al
точность	68%	94%	98%	88%
специфичность	72%	93%	96%	97%
чувствительность	62%	95%	100%	65%

Цель работы *M.F. Rocca и соавт.* [25] была похожа на цели других авторов. Основная идея этой работы заключалась в оценке потенциала технологии MALDI-TOF MS для дифференцировки положительных и отрицательных образцов COVID-19. Для этого необходимо создание масс-спектров из назофарингиальных мазков, чтобы найти конкретные дискриминационные пики с помощью алгоритмов машинного обучения. У *M.F. Rocca и соавт.* [25] процесс подготовки вирусной культуры имеет свои особенности. Матрица состояла из α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, разведенной в 500 мкл ацетонитрила, 250 мкл 10% трифторуксусной кислоты и 250 мкл воды. На каждую лунку стальной пластины наносили 1 мкл образца в трех экземплярах, затем давали высохнуть в течение нескольких минут при комнатной температуре и покрывали 1 мкл матрицы. После высыхания лунок планшет MALDI помещали в прибор MicroFlex LT версии 3.4 (Bruker Daltonics, Бремен, Германия). Данные были собраны между 2000-20000 Да. Все собранные спектры были обработаны с помощью программного обеспечения Flex Analysis v3.4 (Bruker Daltonics, Бремен, Германия). В этой работе использовалось 3 подхода для обнаружения характерных пиков. Сначала была создана «внутренняя» база данных, включающая 9 положительных образцов на COVID-19, 8 отрицательных образцов на COVID-19 и 3 положительные образцы для других респираторных вирусов (Основные профили спектра, MSP). Затем анализ проходил в Flex analysis v3.4 software, ClinPro tools software, где использовался алгоритм машинного обучения KNN. Flex analysis v3.4 software выявило потенциальные пики отрицательности, которые не были обнаружены в положительных образцах: 3372 Да, 3442 Да, 3465 Да, 3488 Да, 6347 Да и 10836 Да. Однако, ни один из обнаруженных пиков не может быть молекулярно отнесен к вирусоспецифическим белкам, поскольку они были явно обнаружены в большинстве отрицательных образцов. Этой работой авторы

продемонстрировали возможности MALDI, что дало начало для дальнейших поисков.

В исследовании *M. Deulofeu и соавт.* [10], анализ данных проводился на 237 образцах, общее количество выборки составило 708 образцов, т.к. от 1 человека было получено 3 образца, которые в дальнейшем анализировались как самостоятельные единицы. Образцы были собраны в транспортные среды: DeltaSwab ViCUM или DeltaSwab Virus. Инактивация образцов проводилась с использованием Ribospin vRD Buffer VL (GeneAll, Корея), основным компонентом которого является тиоцианат гуанидина в концентрации 60–70%. Далее смешивали 300 мкл буфера с 300 мкл транспортной средой в которой находился образец. Перед проведением анализа на масс-спектрометре образцы сначала разбавляли в 10 мкл воды Milli-Q. Затем их смешивали в соотношении 1:1 с раствором синапиновой кислоты (20 мг/мл синапиновой кислоты и, ацетонитрил в смеси 60%:40% (v/v)) и водой Milli-Q с 0,3% трифторуксусной кислоты. Наконец, 1 мкл смеси наносили на очищенную пластину-мишень из нержавеющей стали трехкратно и давали высохнуть при комнатной температуре. Масс-спектрометрия проводилась на Autoflex maX with Time-Of-Flight (TOF) analyzer from Bruker Daltonics (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Образцы масс-спектров представляли собой сумму 1800 удовлетворительных снимков, сделанных с шагом в 300 снимков. Все масс-спектры были получены с использованием программного обеспечения FlexControl, и каждый спектр состоял из более чем 25 000 значений m/z с соответствующими интенсивностями в диапазоне масс от 5 до 20 кДа. Сглаживание масс-спектров по методу Савицкого-Голея, вычитание базовой линии по методу Top-Hat и повторную калибровку каждого масс-спектра проводили с использованием программного обеспечения FlexAnalysis 3.4. Для анализа были использованы алгоритмы машинного XBOOST и SVM. Наконец, F1-Score использовался в качестве показателя эффективности для выбора наиболее подходящей

разработанной модели. В данной работе авторы пришли к заключению, что транспортная среда значительно определяет конечные результаты: точность (DeltaSwab ViCUM = 0.879 ± 0.065 против DeltaSwab Virus = 0.594 ± 0.107), чувствительность (DeltaSwab ViCUM = 0.652 ± 0.176 против DeltaSwab Virus = 0.381 ± 0.206), и специфичность (DeltaSwab ViCUM = 0.969 ± 0.031 против DeltaSwab Virus = 0.688 ± 0.133). Алгоритм машинного обучения SVM приемлем для этой модели. Интересное замечание делают авторы, что ввиду возможных ложных результатов ПЦР теста возникают препятствия для оценки альтернативных методов, т.к. эталон (ПЦР) не гарантирует 100% проверку.

Другая группа авторов во главе с *N.K. Tran* [29] масс-спектрометрические испытания проводили на анализаторе MALDI-TOF-MS Shimadzu 8020 (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD). Выборка составила 226 мазков, которые помещались в солевую транспортную среду. Подготовка образца проводилась следующим образом, назальные мазки извлекали из транспортной среды и помещали непосредственно на пластину-мишень MALDI-TOF-MS. Кончиком зонда слегка постукивали по мишени, чтобы получить каплю ~ 1 мкл в лунке. После посева тампона добавляли 1 мкл смеси α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, этанола, ацетонитрила и водного раствора с 3% трифторуксусной кислотой. Посеянные образцы затем инактивировали ультрафиолетовым (УФ) облучением в течение 10 минут. Настройки MALDI-TOF-MS включали диапазон масс от 2000 до 20 000 дальтон. Для каждого профиля было произведено десять лазерных выстрелов с частотой 100 Гц (всего 1000 импульсов на лунку) и метод сглаживания по Гауссу. Вычитание базовой линии и сглаживание после сбора данных выполнялись с использованием программного обеспечения MALDI Solutions. Выделение пиков выполняли с помощью программного обеспечения MALDIQuant. Алгоритм Threshold Apex использовался для выбора пика, где масса пика назначается путем выбора самой высокой точки на пике. Машинное обучение проводилось на базе автоматизированной платформы Machine Intelligence Learning Optimizer (MILO) (MILO ML, LLC, Сакраменто, Калифорния). В случае этого исследования MILO определил две очень многообещающие модели машинного обучения (DNN и GBM). Модель DNN - 487 пиков в диапазоне 1993,91–19 590,89 м/з, вторая модель GBM 166 пиков в диапазоне 2002,72–19 590,89 м/з. Примечательно, в этом исследовании тестировали непосредственно тампон, а не транспортный носитель. А платформа MILO является автоматическим машинным обучением, что в условиях пандемии сохраняет время, т.к. ручное программирование моделей машинного обучения трудоемко и подвержено предвзятости пользователя.

Анализ назофарингеальных мазков проводился также и *F.M. Nachtigall и соавт.* [23], ими было собрано 362 образца из 3 лабораторий с разных стран. Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью времяпролетного MALDI (Autoflex, Bruker) с импульсным азотным лазером. Раствор матрицы готовили с α -циано-гидроксикоричной кислотой в концентрации (1:1) 1%

ацетонитрила/0,1% трифторуксусной кислоте. 1 мкл образца мазка из носоглотки наносили на пластину из стали MALDI с последующим добавлением 1 мкл матричного раствора и сушили на воздухе. Перед анализом на масс-спектрометре пластины MALDI окончательно облучали ультрафиолетовой лампой внутри бокса биозащиты в течение не менее 20 минут. Диапазон масс составлял от 3 до 20 кДа. Файлы MALDI-MS с помощью MSconvert из набора ProteoWizard были конвертированы в mzML, а затем предварительно обработаны в R MALDIquant и MALDIquantForeign. Все спектры были обрезаны в диапазоне от 3 до 15,5 кДа. Было применено преобразование квадратного корня и реализовано сглаживание по методу Савицкого-Голля. Базовую коррекцию проводили с помощью алгоритма TopHat, а интенсивность нормализовали с помощью метода калибровки полного ионного тока. Чтобы исправить различия в калибровке между образцами, полученными с помощью Bruker Autoflex, и Shimadzu, и Bruker Microflex, использовали команду MALDIquant warpMassSpectra. Для поиска лучшего алгоритма первоначальная классификация машинного обучения была выполнена с 80 образцами. Для классификации SARS-CoV-2 и контрольных образцов были выбраны шесть различных алгоритмов машинного обучения (NB, SVM-L, SVM-R, KNN, DT и RF). Объединив методы без FS, Ig FS и Cfs с 6 алгоритмами было получено 18 моделей машинного обучения. Для модели была проведена внутренняя и внешняя перекрестная валидация. Следует отметить, что наиболее существенную разницу в интенсивности показал пик с m/z 3358, а пик m/z 7612 был общим для всех образцов с разных лабораторий. После анализа полученных результатов стало понятно, что SVM-R без FS оказался лучшим методом. Надежность модели была проверена на всей выборке и продемонстрировала возможность применения для обнаружения SARS-CoV-2.

Используя носоглоточные мазки, было проведено секвенирование гена коронавируса для оценки возможностей MALDI-TOF MassARRAY в сравнении с методом ПЦР [31, 26]. Обе работы определили, что время, затраченное на определение 2 таргетов (ORF1ab, N) методом ПЦР, меньше, однако, масс-спектрометр может определить 5 мишеней (ORF1ab, ORF1, N1, N2, N3). Достоинством масс-спектрометра является и то, что во время определения вируса возможно определить и мутацию.

Группа ученых также с целью определения мутация представила технологию, названную технология минисеквенирования мПЦР-МС, объединив ПЦР и MALDI-TOF. В качестве биоматериала использовались мокрота, мазок из носоглотки и бронхолегочные смывы [37].

Уровень соответствия ПЦР и MALDI составил более 80%, что приемлемо для диагностического подхода [23]. Время анализа на MALDI масс-спектрометрии составляет 20 минут, в сравнение с ПЦР тестом требует использование легкодоступных химических веществ. MALDI масс-спектрометрия вполне может быть использована наряду с ПЦР диагностикой в качестве скринингового метода. Потенциал MALDI-TOF

MassARRAY показал большую чувствительность в определении вирусной РНК, не теряя других диагностических характеристик. Это дает перспективы использования технологии вместо ПЦР теста [26].

Перспективы применения MALDI-TOF MS для детекции SARS-CoV-2.

Слюна как объект исследования вызывает интерес неинвазивностью забора метода и простотой получения материала [16, 6, 9]. Обнаружить присутствие вируса в слюне возможно не прямым обнаружением белков, а скорее выявлению их специфической белковой сигнатуры при моделировании методами машинного обучения после получения информации о характерных пиках образца в MALDI-TOF масс-спектрометрии [9]. Подобный подход применим для быстрой идентификации зараженных пациентов. Вместе с тем, применяя масс-спектрометрию возможно идентифицировать белки, интенсивность которых возрастает у зараженной когорты, а также оценить иммунный ответ хозяина [16, 6].

Перспективы применения MALDI-MS не ограничиваются обнаружением SARS-CoV-2. Согласно исследованиям Q. Wan и соавт. [30] на образцах крови можно провести анализ метаболитов с целью выявления бессимптомных больных с предварительной экстракцией сыворотки, для получения результатов необходимо использовать комбинации методов машинного обучения, так называемый «алгоритм голосования». В качестве метаболитов использовались фосфолипиды и аминокислоты, пурины и нуклеозиды, глутаминовая кислота, тирозин, таурин, ксантин и уридин. Такой подход может благотворно сдерживать распространение вируса, т.к. проверять потенциально больных более экономически выгодно используя MALDI-MS [30].

В работе R.M. Gomila и соавт. [13] приводится классификация пациентов по степени тяжести течения заболевания, которая дает возможность в условиях стационара быть готовым заблаговременно выбрать оптимальную тактику лечения для определенного пациента. Дополнительно можно прогнозировать риск ухудшения состояния пациентов [19, 13].

Группа ученых провела эксперимент с целью оценки применения масс спектрометра для определения мутаций спайк-белка коронавируса. Для осуществления этих целей вирус был выращен в лабораторных условиях и далее подвергнут изучению. Согласно их результатам, возможно проведение картирования вируса и наглядно представить мутационные пути между белками. Применяя эту стратегию возможно быстрее построить филогенетическое дерево и изучить эволюцию вируса [22].

Заключение

В данной работе мы продемонстрировали потенциал применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для детекции SARS-CoV-2 в назофарингиальных мазках. Согласно изученной литературе использование масс-спектрометрии возможно в качестве альтернативного метода ОТ-ПЦР. Однако, для широкого использования метода необходимо обозначить единый протокол работы. Важным

недостатком метода является отсутствие утвержденной базы данных для идентификации вирусов. Некоторые группы ученых создают свои базы для обработки материала [25]. Процесс подготовки композиций культуры также нуждается в стандартизации: выбор матрицы и транспортной среды влияет на эффективность обнаружения [10, 3]. Тем не менее ученые предсказывают широкое использование MALDI-TOF масс-спектрометрии для выявления SARS-CoV-2, после устранения вышеизложенных препятствий и стандартизации рабочего процесса [3].

Таким образом, после проведения анализа данных применения времяпролетной масс-спектрометрии для выявления коронавирусной инфекции в назофарингиальных мазках можно сделать вывод, что метод может быть использован для детекции SARS-CoV-2. В условиях пандемии возможно его использование для крупномасштабного тестирования/скрининга населения в развивающихся странах, где ограничены возможности лабораторной службы. Для представленной методологии требуется валидация и создание единого протокола работы для повсеместного внедрения в диагностическую практику.

Данная работа выполнена в рамках научного проекта грантового финансирования Министерства образования и науки РК (AP09259123) «Обнаружение SARS-CoV-2 в назальных мазках с помощью MALDI-MS и методов машинного обучения».

Вклад авторов: Все авторы внесли равный вклад в подготовку и написание статьи.

Конфликт интересов: Авторы со всей ответственностью заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Сведения о публикации: Подтверждаем, что материалы, представляемые в данной статье, не были опубликованы в другом печатном издании.

Литература:

1. Ai T., Yang Z., Hou H., Zhan C., Chen C., Lv W., Tao Q., Sun Z., Xia L. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases// Radiology. 2020. №296. P. 32-40. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200642> (Дата обращения: 01.03.2021)
2. Alizadeh M., Yousefi L., Pakdel F., Ghotaslou R., Rezaee M.A., Khodadadi E., Oskouei M.A., Soroush Barhaghi M.H., Kafil H.S. MALDI-TOF Mass Spectroscopy Applications in Clinical Microbiology // Adv Pharmacol Pharm Sci. 2021. №2021(9928238). P.1-8 doi: <https://doi.org/10.1155/2021/9928238>. (Дата обращения: 16.05.2021)
3. Buszewski B., Maslak E., Zloch M., Railean-Plugaru V., Kłodzinska E., Pomastowski P. A new approach to identifying pathogens, with particular regard to viruses, based on capillary electrophoresis and other analytical techniques// Trends in Analytical Chemistry. 2021. №139. P.1-13 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116250> (дата обращения: 01.02.2022)
4. Chan J.F., Yuan S., Kok K.H., To K.K., Chu H., Yang J., Xing F., Liu J., Yip C.C., Poon R.W. et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: A

study of a family cluster// *Lancet*. 2020. №395. 514–523. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9) (Дата обращения: 01.03.2021)

5. Chen Z, Xu W, Ma W, Shi X, Li S, Hao M, Fang Y, Zhang L. Clinical laboratory evaluation of COVID-19 // *Clinica Chimica Acta*. 2021. №519. P.172–182 <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.04.022> (Дата обращения: 13.12.2021)

6. Chivte P., LaCasse Z., Seethi V. D. R., Bharti P., Bland J., Kadkol S.S., Gaillard E.R. MALDI-ToF protein profiling as a potential rapid diagnostic platform for COVID-19 // *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab*. 2021. №21. P.31–41 <https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2021.09.001> (Дата обращения: 13.12.2021)

7. Conti B.J., Leicht A.S., Kirchdoerfer R.N., Sussman M.R. Mass spectrometric based detection of protein nucleotidylation in the RNA polymerase of SARS-CoV-2 // *Communications Chemistry*. 2021. №4. P.1-11 <https://doi.org/10.1038/s42004-021-00476-4> (Дата обращения: 13.12.2021)

8. Costa J., Ferreira E.C., Santos C. COVID-19, Chikungunya, Dengue and Zika Diseases: An Analytical Platform Based on MALDI-TOF MS, IR Spectroscopy and RT-qPCR for Accurate Diagnosis and Accelerate Epidemics Control // *Microorganisms*. 2021. №9. P.1-15 <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040708> (Дата обращения: 13.04.2021)

9. Costa M.M., Martin H., Estellon B., Dupé F., Saby F., Benoit N., Tissot-Dupont H., Million M., Pradines B., Granjeaud S., Almeras L. Exploratory Study on Application of MALDI-TOF-MS to Detect SARS-CoV-2 Infection in Human Saliva // *J. Clin. Med*. 2022. №11. P. 1-18 <https://doi.org/10.3390/jcm11020295> (Дата обращения: 06.04.2021)

10. Deulofeu M., García-Cuesta E., Peña-Méndez E. M., Conde J. E., Jiménez-Romero O., Verdú E., Serrando M. T., Salvadó V., Boadas-Vaello P. Detection of SARS-CoV-2 Infection in Human Nasopharyngeal Samples by Combining MALDI-TOF MS and Artificial Intelligence // *Frontiers in Medicine*. 2021. №8. P. 1-12 <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.661358> (Дата обращения: 19.01.2022)

11. Feng H., Liu Y., Lv M., Zhong J. A case report of COVID-19 with false negative RT-PCR test: Necessity of chest CT// *Japanese Journal of Radiology*. 2020. №38. P.409–410 <https://doi.org/10.1007/s11604-020-00967-9> (Дата обращения: 01.03.2021)

12. Gong F., Wei H., Li Q., Liu L., Li B. Evaluation and Comparison of Serological Methods for COVID-19 Diagnosis // *Frontiers Molecular Biosciences*. 2021. №8. P. 1-12 doi: 10.3389/fmolb.2021.682405 (Дата обращения: 13.12.2021)

13. Gomila R.M., Martorell G., Fraile-Ribot P.A., Doménech-Sánchez A., Oliver M. A.A., García-Gasalla M., Alberti S. Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of-Flight Mass Spectrometry Analysis of Serum Peptidome to Classify and Predict Coronavirus Disease // *Open Forum Infectious Diseases*. 2021. №8. P.1-8 DOI: 10.1093/ofid/ofab222 (Дата обращения: 19.01.2022)

14. Green K., Winter A., Dickinson R., Graziadio S., Wolff R., Mallett S., Allen A.J., Park E.B. What tests could potentially be used for the screening, diagnosis and monitoring of COVID-19 and what are their advantages and disadvantages? 2020 [Электронный ресурс]. <https://www.cebm.net/covid-19/what-tests-could-potentiallybe-used-for-the-screening-diagnosis-and-monitoring-of-covid-19-and-what-are-theiradvantages-and-disadvantages/>. (Дата обращения 9.02.22)

15. Gurard-Levin Z.A., Liu C., Jekle A., Jaisinghani R., Ren S., Vandyck K., Jochmans D., Leyssen P., Neyts J., Blatt L.M., Beigelman L., Symons J. A., Raboisson P., Scholle M.D., Deval J. Evaluation of SARS-CoV-2 3C-like protease inhibitors using self-assembled monolayer desorption ionization mass spectrometry// *Antiviral Research*. 2020. №182. P. 1-11 <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104924> (Дата обращения: 13.12.2021)

16. Iles R.K., Zmuidinaite R., Iles J.K., Carnell G., Sampson A., Heeney J.L. Development of a Clinical MALDI-ToF Mass Spectrometry Assay for SARS-CoV-2: Rational Design and Multi-Disciplinary Team Work // *Diagnostics*. 2020. №10. P. 1-15 doi:10.3390/diagnostics10100746 (Дата обращения: 06.04.2021)

17. Ji T., Liu Z., Wang G., Guo X., Akbar khan S., Lai C., Chen H., Huang S., Xia S., Chen B., Jia H., Chen Y., Zhou Q. Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives // *Biosensors and Bioelectronics*. 2020. №166. P. 1-18 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112455> (Дата обращения: 06.04.2021)

18. John Hopkins university coronavirus resource center [Электронный ресурс] <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (Дата обращения: 20.04.2022)

19. Lazari L.C., Ghilardi F.R., Fernandes L.R., Assis D.M., Nicolau J.C., Santiago V.F., Dalçóquio T.F., Angeli C. B, Bertolin A.J., Marinho C.R., Wrenger C., Durigon E.L., Siciliano R.F., Palmisano G. Prognostic accuracy of MALDI-TOF mass spectrometric analysis of plasma in COVID-19 // *Life science alliance*. 2022. №4. P. 1-12 <https://doi.org/10.26508/lsa.202000946> (Дата обращения: 16.01.2022)

20. Masters P.S. Coronavirus genomic RNA packaging // *Virology*. 2019. №537. 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.08.031> (Дата обращения: 09.02.2022)

21. Mahmud I., Garrett T. J. Mass Spectrometry Techniques in Emerging Pathogens Studies: COVID-19 Perspectives // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2020. №31. P. 2013-2024 <https://dx.doi.org/10.1021/jasms.0c00238> (Дата обращения: 19.04.2021)

22. Mann C., Downard K.M. Evolution of SARS CoV-2 Coronavirus Surface Protein Investigated with Mass Spectrometry Based Phylogenetics // *Analytical Letters*. 2022. №55. P. 305 – 317 (Дата обращения: 19.01.2022)

23. Nachtigall F.M., Pereira A., Trofymchuk O.S., Santos L.S. Detection of SARS-CoV-2 in nasal swabs using MALDI-MS // *Nature Biotechnology*. 2020. №38. P. 1168–

- 1173 <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0644-7> (Дата обращения: 16.04.2021)
24. Ribeiro da Silva S.J., Alves da Silva C.T., Guarines K.M., Mendes R.P., Pardee K., Kohl A., Pena L. Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19 // *Infectious Diseases*. 2020. №6. P.2316-2336
<https://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00274> (Дата обращения: 09.02.2022)
25. Rocca M.F., Zintgraff J.C., Dattero M.E., Santos L.S., Ledesma M., Vay C., Prieto M., Benedetti E., Avaro M., Russo M., Nachtigall F.M., Baumeister E. A combined approach of MALDI-TOF mass spectrometry and multivariate analysis as a potential tool for the detection of SARS-CoV-2 virus in nasopharyngeal swabs // *Journal of Virological Methods*. 2020. №286. P. 1-7
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113991> (Дата обращения: 16.04.2021)
26. Rybicka M., Mikosz E., Bielawski K. P. Superiority of MALDI-TOF Mass Spectrometry over Real-Time PCR for SARS-CoV-2 RNA Detection // *Viruses*. 2021. №13. P. 1-11
<https://doi.org/10.3390/v13050730> (Дата обращения: 08.02.2022)
27. SoRelle J.A., Patel K., Filkins L., Park J.Y. Mass Spectrometry for COVID-19 // *Clinical chemistry*. 2020. №66. P. 1367–1368 DOI: 10.1093/clinchem/hvaa222 (Дата обращения: 16.03.2021)
28. Tran A., Monreal I.A., Moskovets E., Aguilar H.C., Jones J.W. Rapid Detection of Viral Envelope Lipids Using Lithium Adducts and AP-MALDI High-Resolution Mass Spectrometry // *J Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2021. № 9. P. 2322-2333. doi: 10.1021/jasms.1c00058. (Дата обращения: 16.05.2021)
29. Tran N.K., Howard T., Walsh R., Pepper J., Loegering J., Phinney B., Salemi M. R., Rashidi H.H. Novel application of automated machine learning with MALDI-TOF MS for rapid high-throughput screening of COVID-19: a proof of concept // *Scientific Reports*. 2021. №11. P. 1-10
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-87463-w> (Дата обращения: 07.02.2022)
30. Wan Q., Chen M., Zhang Z., Yuan Y., Wang H., Hao Y., Nie W., Wu L., Chen S. Machine Learning of Serum Metabolic Patterns Encodes Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection // *Frontiers in Chemistry*. 2021. №9. P. 1-9 doi: 10.3389/fchem.2021.746134 (Дата обращения: 19.01.2022)
31. Wandernoth P., Kriegsmann K., Groh-Mohanu C., Daeumer M., Gohl P., Harzer O., Kriegsmann M., Kriegsmann J. Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by Mass Spectrometry // *Viruses*. 2020. №12. P. 1-8 doi:10.3390/v12080849 (Дата обращения: 06.04.2021)
32. WHO Coronavirus disease (COVID-19) pandemic [Электронный ресурс]
<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (Дата обращения: 20.04.2022)
33. WHO Kazakhstan COVID - Coronavirus Statistics - Worldometer. [Электронный ресурс]. 2020 г.
<https://covid19.who.int/region/euro/country/kz> (Дата обращения: 20.04.2022)
34. Xie X., Zhong Z., Zhao W., Zheng, C.; Wang, F.; Liu, J. Chest CT for Typical 2019-nCoV Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing // *Radiology*. 2020. №296. P. 41-45.
<https://doi.org/10.1148/radiol.2020200343> (Дата обращения: 01.03.2021)
35. Yan L., Yi J., Huang C., Zhang J., Fu S., Li Z., Lyu Q., Xu Y., Wang K., Yang H., Ma Q., Cui X., Qiao L., Sun W., Liao P. Rapid Detection of COVID-19 Using MALDI-TOF-Based Serum Peptidome Profiling // *Analytical Chemistry*. 2021. №93. P. 4782-4787
<https://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04590> (Дата обращения: 13.04.2021)
36. Younes N., Al-Sadeq D.W., AL-Jighefee H., Younes S., Al-Jamal O., Daas H. I., Yassine H. M., Nasrallah G.K. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2 // *Viruses*. 2020. №12(582). P. 1-27. doi:10.3390/v12060582 (Дата обращения: 01.03.2021)
37. Zhao F., Lu J., Lu B., Qin T., Wang X., Hou X., Meng F., Xu X., Li T., Zhou H., Zhang J., Kan B., Huang Y., Zhang Z., Xiaoa D. A Novel Strategy for the Detection of SARS-CoV-2 Variants Based on Multiplex PCR-Mass Spectrometry Minisequencing Technology // *Microbiology Spectrum*. 2021. №9. 3. P.1-10
<https://doi.org/10.1128/Spectrum.01267-21> (Дата обращения: 13.12.2021)

Контактная информация:

Султанбекова Айдана Аскарровна - докторант PhD по специальности «Медицина» НАО "Медицинский Университет Караганды", г. Караганда, Республика Казахстан.

Почтовый адрес: Республика Казахстан, 100000, г. Караганда, Проспект Шахтеров 31Б, 96.

E-mail: A.Sultanbekova@qmu.kz.

Телефон: 87715263120