

А.Н.Спицын, Д.В.Уткин, В.Е.Куклев, С.А.Портенко, В.Г.Германчук, Н.А.Осина

## ПРИМЕНЕНИЕ MALDI МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ДИАГНОСТИКЕ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

Масс-спектрометрия является современным физико-химическим методом анализа, позволяющим проводить качественный и количественный анализ состава вещества, основанный на предварительной ионизации входящих в его состав атомов или молекул. Одним из новых методов ионизации, благодаря которому масс-спектрометрическое исследование макромолекул получило широкое распространение, является разработанная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI), представляющая собой импульсное лазерное облучение исследуемого вещества, смешанного с матрицей. В обзоре представлены современные данные о применении метода MALDI масс-спектрометрии для проведения родо- и видоспецифической идентификации микроорганизмов в практике диагностических лабораторий. Рассмотрены преимущества MALDI-TOF идентификации по сравнению с бактериологическими, иммунологическими и молекулярно-генетическими методами исследования. Обозначено место масс-спектрометрии в системе лабораторной диагностики инфекционных болезней, в том числе особо опасных на территории Российской Федерации.

*Ключевые слова:* MALDI масс-спектрометрия, MALDI-TOF, идентификация, патогенные биологические агенты.

A.N.Spitsyn, D.V.Utkin, V.E.Kuklev, S.A.Portenko, V.G.Germanchuk, N.A.Osina

## Application of MALDI Mass-Spectrometry for Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases: Current State of Affairs and Prospects

*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

Mass spectrometry is a modern physical-chemical analytical method that provides for qualitative and quantitative assessment of the substance composition. It is based on pre-ionization of the atoms and molecules included into it. One of the advanced methods of ionization, due to which mass-spectrometry investigation of macromolecules has become a frequent practice, is matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI). The essence of it is the pulsed laser irradiation of the matter under study, mixed with the matrix. The review discusses current data on MALDI mass-spectrometry application for the performance of species-specific and genus-specific identification of microorganisms at the premises of diagnostic laboratories. Considered are the basic advantages of MALDI-TOF identification as compared to bacteriologic, immunologic, and molecular-genetic methods of assessment. Allocated is the mass-spectrometry position in the system of laboratory diagnostics of infectious diseases, including particularly dangerous ones, in the territory of the Russian Federation.

*Key words:* MALDI mass-spectrometry, MALDI-TOF, identification, pathogenic biological agents.

В настоящее время основными методами лабораторной диагностики бактериальных инфекционных болезней являются бактериологический, иммунологический и молекулярно-генетический [6].

В основе бактериологического метода лежит выделение чистой культуры возбудителя и его дальнейшая идентификация по комплексу морфологических, культуральных, тинкториальных, биохимических и антигенных признаков. Для выделения чистой культуры возбудителя путем посева исследуемого материала на питательные среды требуется время от 18–24 ч до нескольких суток [7]. Чувствительность метода составляет  $10^2$  м.к./мл [9].

Иммунологические методы лабораторной диагностики основаны на регистрации специфического взаимодействия антигенов и антител. Среди методов иммунологического анализа в практических лабораториях применяют реакцию агглютинации (РА), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), а также методы с использованием меченых антител и антигенов – метод флуоресцирующих антител

(МФА), иммуноферментный анализ (ИФА), иммуноферментный анализ с магнитоиммосорбентами (ИФА+МИС), иммунохроматографический анализ (ИХА) [9]. Чувствительность данных методов составляет: РА –  $10^8$ – $10^9$  м.к./мл, РНГА –  $10^8$  м.к./мл, МФА, ИФА –  $10^5$ – $10^6$  м.к./мл, ИФА+МИС –  $10^3$ – $10^4$  м.к./мл, ИХА –  $2 \cdot 10^5$ – $2 \cdot 10^6$  м.к./мл, а специфичность напрямую зависит от качества используемых антител и может достигать 100 % [24, 33, 38]. Время анализа составляет от 20 мин (ИХА) до 2–4 ч (ИФА) [7].

Среди молекулярно-генетических методов широкое распространение получил метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на многократном избирательном копировании (амплификации) определенного участка ДНК. В настоящее время, наряду с ПЦР с учетом результатов методом электрофореза применяют технологию ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов, принципиальной особенностью которой является количественный анализ накопления продуктов ПЦР в каждом цикле реакции, а также автоматическая регистрация и интер-

претация полученных результатов. Для определения нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК используется метод секвенирования путем получения серии комплементарных молекул ДНК, различающихся по длине на одно основание. Для молекулярно-генетических методов характерна 100 % специфичность и высокая чувствительность:  $1 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^3$  м.к./мл. Время анализа составляет 2–3 ч [7].

Несмотря на многообразие существующих методов, ни один из них не лишен недостатков. Бактериологический метод является длительным, интерпретация его результатов зависит от квалификации исследователя. Иммунологические методы имеют недостаточно высокую чувствительность. Для ПЦР характерна высокая стоимость анализа, многоэтапность проведения анализа, строгие требования к оснащению лаборатории и качеству тест-наборов, отсутствие возможности анализа белков, углеводов.

В настоящее время в лабораторной диагностике инфекционных болезней, наряду с традиционными методами индикации и идентификации, получили распространение физические и физико-химические методы анализа, базирующиеся на количественном измерении физических свойств веществ и характеризующиеся высокой автоматизацией, скоростью и простотой исследований. Для выявления и определения микроорганизмов в объектах окружающей среды используется ультрафиолетовая (УФ), видимая и инфракрасная (ИК) спектроскопия. Данные методы основаны на анализе спектра поглощения исследуемого материала. Спектр поглощения клеток микроорганизмов складывается из спектров поглощения входящих в их состав биологических молекул и кривой светорассеяния [1, 5, 11]. Так, большинство белков микроорганизмов и нуклеиновых кислот имеют максимум поглощения в УФ-диапазоне при длинах волн 289 нм и 260 нм, соответственно, что обусловлено в первом случае присутствием ароматических аминокислот (триптофана, фенилаланина, тирозина), алифатических боковых цепей аминокислот и пептидных связей — CO — NH —, а в случае нуклеиновых кислот пуриновыми и пиримидиновыми основаниями [4]. При ИК-излучении в диапазоне длин волн 2–50 мкм некоторые функциональные группы макромолекул (C–H, O–H, N–H, C=C, C=N, C=O и др.) имеют характерный набор полос поглощения, являющихся индивидуальной характеристикой соединения [8]. Чувствительность спектроскопических методов достигает  $10^3$  м.к./мл [10]. Кроме того, для идентификации микроорганизмов применяют метод Раман-спектроскопии, основанный на комбинационном рассеянии света или эффекте Рамана [14], отличающийся от остальных видов спектроскопии широким диапазоном длин волн – от УФ до ИК. При этом число и расположение линий в спектре рассеянного излучения определяется молекулярным строением вещества. Чувствительность метода составляет  $5 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^5$  м.к./мл [49].

Преимуществами методов ультрафиолетовой,

инфракрасной и Раман-спектроскопии являются: отсутствие процедуры пробоподготовки, что позволяет достичь высокой скорости проведения анализа (до 5 мин), отсутствие прямого физического контакта исследователя с исследуемым материалом (бесконтактный метод) [31], что особенно важно при исследовании образцов, содержащих или подозрительных на содержание патогенных биологических агентов. Недостатком индикации биологических частиц методом УФ-спектроскопии является возможность появления ложноположительных результатов из-за присутствия в воздухе аэрозолей, содержащих посторонние вещества и невозможность проведения идентификации микроорганизмов. Для ИК-спектроскопии невозможна дифференциация биологических и небологических частиц, при этом Раман-спектроскопия позволяет исследовать только чистую культуру и требует дорогостоящего оборудования. Раман-спектры микроорганизмов зависят от способа подготовки материала [50].

Одним из современных физико-химических методов анализа, позволяющий решить проблемы спектроскопических методов является метод масс-спектрометрии, дающий возможность проводить качественный и количественный анализ состава вещества. Принцип масс-спектрометрического анализа основан на предварительной ионизации атомов и молекул, входящих в состав пробы, дальнейшего разделения ионов исследуемого вещества в вакууме под действием электрических и магнитных полей и регистрации результатов в виде масс-спектра. Масс-спектр представляет собой зависимость интенсивности ионного тока молекулы от отношения ее массы к заряду и является характеристикой анализируемого вещества, отражающей особенности его строения.

Одним из новых методов ионизации, благодаря которому масс-спектрометрическое исследование макромолекул получило широкое распространение, является разработанная в конце 80-х годов XX в. матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI). В основе метода MALDI лежит импульсное лазерное облучение исследуемого вещества, смешанного с матрицей, представляющей собой химическое соединение, чаще всего органическую кислоту.

Времяпролетная MALDI масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS) является новой технологией в клинической диагностике, позволяющей проводить идентификацию микроорганизмов, определять таксономическое положение неизвестных возбудителей. Данный метод включает прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции лизата микробной клетки («прямое белковое профилирование»), предметом которого служат преимущественно рибосомальные белки, являющиеся консервативными в пределах вида микроорганизма. Чувствительность метода MALDI-TOF MS составляет  $10^3 - 10^6$  м.к./мл [18]. При этом точность микробиологической идентификации зависит от количества

исследуемого материала. Специфичность видовой идентификации составляет до 97,6 % [13], время анализа занимает от 6 до 8,5 мин, стоимость анализа методом MALDI TOF составляет 17–32 % от стоимости идентификации традиционными бактериологическими методами [43]. Для повышения чувствительности метода MALDI был предложен иммуноаффинный вариант MALDI MS/MS (iMALDI) анализа [27] с применением специфических антител иммобилизованных на аффинных частицах. Чувствительность iMALDI анализа составила 10 м.к./мл и 10–100 аттомоль белковых молекул.

A.Cherkaoui *et al.* [17] использовали метод MALDI–TOF масс-спектрометрии для идентификации 416 клинических изолятов семейства *Enterobacteriaceae* (216 – *Escherichia coli*, 38 – *Klebsiella pneumoniae*, 35 – *Enterobacter cloacae*, 32 – *Proteus mirabilis*, 24 – *Serratia marcescens*, 19 – *Klebsiella oxytoca*, 12 – *Citobacter koseri*, 12 – *Morganella morganii* и др.). При этом специфичность родовой идентификации была близка к 100 %, а сами результаты MALDI-TOF идентификации были подтверждены традиционными биохимическими тестами, при этом проблема несопадающих результатов разрешалась секвенированием гена 16S рНК. Точность идентификации видов для родов *Enterobacteriaceae* составила 97,7 % при анализе 311 изолятов [45]. Результаты MALDI-TOF идентификации были подтверждены традиционными биохимическими тестами.

A.Mellmann *et al.* [35] провели MALDI-TOF MS идентификацию 78 штаммов неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов. Все штаммы параллельно были проанализированы секвенированием гена 16S рНК, использованного в качестве референсного метода. MALDI-TOF масс-спектрометрия идентифицировала 85,9 % изолятов, согласующихся с результатами секвенирования, при этом 82,5 % изолятов были правильно определены на видовом уровне и 95,2 % на уровне рода. S.Q. van Veen *et al.* [48] идентифицировали 88 изолятов неферментирующих бактерий до рода 94,3 % и 92 % до вида. Бактериологические методы с использованием автоматических анализаторов Vitek-2, API-тест-систем в указанных исследованиях позволили определить 93,2 % микроорганизмов до рода и 87,5 % до вида. A.Cherkaoui *et al.* [17] провели исследование 80 изолятов неферментирующих бактерий методом MALDI. В результате точность измерений составила 100 % при родовой и 97,5 % при видовой идентификации.

S.Q. van Veen *et al.* [48] провели MALDI-TOF MS исследование грамположительных кокков, предварительно идентифицированных традиционными методами (Vitek-2, API-тест-системы, биохимические тесты). Для подтверждения идентификации, в случае несоответствия результатов, проводилось дополнительно секвенирование гена 16S рНК. Анализ 261 клинического изолята стафилококков показал 100 % результат соответствия на родовом уровне и 94,3 % на видовом, а для 165 штаммов стрептококков точ-

ность родовой и видовой идентификации составила 98,8 и 84,8 % соответственно. Традиционные методы при этом показали 99,2 % родовой и 63,2 % видовой идентификации стафилококков, для стрептококков эти значения составили 100 и 87,9 % соответственно. Для 111 изолятов стафилококков специфичность MALDI-TOF родовой идентификации составила 100 и 98,2 % видовой, а для 87 изолятов стрептококков – 100 и 73,6 % соответственно [17]. L.G.Harris *et al.* [25] идентифицировали 158 изолятов стафилококков со 100 % точностью на уровне рода и вида.

A.Cherkaoui *et al.* [17] применили метод масс-спектрометрического анализа при идентификации анаэробных бактерий. При 100 % определении рода, процент видовой идентификации для анаэробов составил от 17 до 57 %.

Трудности лабораторной внутриродовой и внутривидовой дифференциации бактерий связаны с наличием общих биохимических свойств, морфологических, тинкториальных характеристик, присутствием родоспецифических и перекрестно реагирующих антигенов. Указанные проблемы присутствуют при лабораторной диагностике возбудителей особо опасных инфекций.

Правильная идентификация является необходимой для дифференциации непатогенных видов рода *Yersinia* от патогенных видов: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*. S.Ayyadurai *et al.* [12] составили базу данных референтных масс-спектров 39 различных штаммов *Yersinia*, представляющих 12 различных видов *Yersinia*, включая 13 штаммов *Y. pestis* биоваров Antiqua, Medievalis и Orientalis. Полученные масс-спектры природных и клинических изолятов *Y. pestis* (n=2) и *Y. enterocolitica* (n=11) были сопоставлены с референтными масс-спектрами базы данных масс-спектрометра и определены корректно. Таким образом, *Y. pestis* была однозначно идентифицирована на видовом уровне, а MALDI-TOF была успешно применена для дифференциации трех биотипов.

E.Seibold *et al.* [40] идентифицировали 45 штаммов *F. tularensis* четырех подвидов (*F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica*, *F. tularensis mediasiatica*, *F. tularensis novicida*) со 100 % специфичностью на уровне вида и подвидов. Результаты MALDI-TOF MS идентификации подтверждены с помощью секвенирования гена 23S рНК.

P.Lasch *et al.* [32] составили базу данных масс-спектров 374 штаммов рода *Bacillus*, среди которых 102 штамма *B. anthracis* и 121 штамм *B. cereus*. V.Ryzhov *et al.* [39] провели MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ 14 микроорганизмов группы *Bacillus cereus*. Полученные масс-спектры показали большое сходство между видами *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis*, так как содержали общие для данных видов биомаркеры, которые отсутствовали у *B. mycoides*.

L.Ferreira *et al.* [20] провели MALDI-TOF MS исследование 131 клинического изолята рода *Brucella*, включая виды *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, пред-

варительно идентифицированных традиционными методами и ПЦР. Точность родовой идентификации составила 100 %, а видовой – 20,6 %. F.Lista *et al.* [34] определили с точностью 99,3 % видовую принадлежность 152 изолятов рода *Brucella*, при этом *B. suis* биоваров 1 и 2 были идентифицированы до уровня биовара.

Л.Г.Гриднева и соавт. [2] использовали MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ для определения таксономической принадлежности холерных вибрионов на основании определения спектра константных белков дополнительно к биохимическим тестам. T.Hazen *et al.* [26] показали возможность применения метода MALDI-TOF MS для дифференциации вида *V. parahaemolyticus* от других видов рода *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. harveyi*, *V. fischeri*, *V. campbellii*, *V. fluvialis*, *V. mediterranei*) и определения биомаркерных пиков, специфичных для *V. parahaemolyticus*.

Помимо исследования цельных клеточных лизатов, MALDI масс-спектрометрия используется для анализа отдельных биологических молекул (нуклеиновых кислот, белков, липидов, полисахаридов, жирных кислот), имеющих диагностическое и/или патогенетическое значение, и представляет альтернативу традиционным хроматографическим методам их определения. Так, F.Kirpekar *et al.* [29] провели MALDI секвенирование тех фрагментов ДНК, которые не могли быть секвенированы традиционными методами из-за наличия многочисленных неспецифичных конечных продуктов, природа которых может быть определена с помощью MALDI-TOF-MS. E.Nordhoff *et al.* [37] разработали протокол для быстрого секвенирования с использованием MALDI-TOF-MS коротких последовательностей ДНК, состоящих из 15–20 п.н., основанный на концепции Сэнгера. Продукты секвенирования разделялись и выявлялись методом MALDI-TOF-MS, а последовательность определялась путем сравнения измеренных молекулярных масс с ожидаемыми значениями. B.Schilling *et al.* [41] применили метод вакуумной MALDI масс-спектрометрии (vMALDI) для получения масс-спектров и определения структуры липида А трех видов рода *Francisella* (*F. tularensis*, *F. novicida* и *F. philomiragia*). A.Silipo *et al.* [45] провели MALDI анализ вторичной структуры жирных кислот, входящих в состав липида А для видов *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. reactans* и *B. caryophylli*. J.Giddey *et al.* [23] осуществили MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ липидов *E. coli* и *B. subtilis*. S.M.A.B.Batouy *et al.* [15] с помощью MALDI масс-спектрометрии с преобразованием Фурье получили липидные и фосфолипидные профили генетически модифицированных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Показана эффективность использования MALDI-MS для идентификации бактериальных токсинов, таких как ботулинический нейротоксин, столбнячный токсин, стафилококковый энтеротоксин [3]. Разработан масс-спектрометрический метод

на основе MALDI, который позволяет определять эндопептидазную активность ботулинических токсинов различных серотипов в клинических образцах [22, 28]. S.J.Shields *et al.* [44] методом MALDI-TOF-MS провели характеризацию С-фрагмента столбнячного токсина и его комплексов с дексорибуцином. Описаны подходы к идентификации энтеротоксина В методом MALDI-TOF в различных средах [16, 36, 42, 47]. Разработан высокочувствительный метод (500 фмоль) для определения энтеротоксина в сложных биологических образцах [30]. Метод MALDI-TOF MS использовался для обнаружения цитотоксина K1 (CytK1) и негемолитического энтеротоксина (NHE), продуцируемых патогенными штаммами группы *B. cereus* [46], а также дельта-токсина *S. aureus* [21] и шига-токсина *E. coli* O157 [19].

Основными преимуществами MALDI-масс-спектрометрии являются: анализ биологических молекул массой до 500 кДа без их разрушения, высокая чувствительность ( $10^{-12}$ – $10^{-21}$  моль вещества), толерантность к соледержащим материалам, возможность работы с многокомпонентными веществами, возможность получения информации о структуре молекул [3].

Внедрение масс-спектрометрического анализа в практику лабораторий федерального уровня позволит проводить быструю идентификацию более 2000 видов микроорганизмов, в том числе неустановленной этиологии и атипичных форм. При этом для идентификации микроорганизмов методом масс-спектрометрического анализа не требуется проведение биохимических тестов. Метод позволяет провести анализ образца в количестве нескольких наногرامмов в течение 1–2 мин.

Таким образом, метод масс-спектрометрического анализа является современным высокоточным инструментом идентификации и дифференциации микроорганизмов, позволяющим повысить эффективность лабораторной диагностики инфекционных болезней.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю.А., Литвин Ф.Ф. Фотобиология и спектральные методы исследования. Практикум по общей биофизике. Вып. 8. М.: Высш. шк.; 1964. 211 с.
2. Гриднева Л.Г., Мусатов Ю.С., Громова Т.В., Пуховская Н.М., Белозерова Н.Б., Уткина О.М., Иванов Л.И., Ковальский А.Г., Миронова Л.В., Куликалова Е.С., Хунхеева Ж.Ю., Балахонов С.В. Результаты мониторинга и биологические свойства холерных вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды на территории хабаровского края. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 1:121–4.
3. Дубровский Я.А., Подольская Е.П. Определение токсинов пептидной природы методом MALDI-MS (обзор). *Научное приборостроение*. 2010; 20(4):21–35.
4. Карнаухова Л.И., Тупицын Е.Н. УФ-спектроскопия биологических макромолекул. Уч.-метод. пособие. Саратов; 2002. 15 с.
5. Мерзляк М.Н., Чивкунова О.Б., Маслова И.П., Накви Р.К., Соловченко А.Е., Клячко-Гурвич Г.Л. Спектры поглощения и рассеяния света клеточными суспензиями некоторых цианобактерий и микроводорослей. *Физиология растений*. 2008; 55(3):464–70.
6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.; 2009. 472 с.
7. Онищенко Г.Г., редактор. Руководство по специфической индикации патогенных биологических агентов. М.: ЗАО «МП Гигиена»; 2006. 288 с.

8. Справочник химика. Т. 4. Аналитическая химия. Спектральный анализ. Показатели преломления. Л: Химия; 1967.
9. Современные методы микробиологических исследований. Воронеж; 2007. 69 с.
10. Уткин Д.В., Куклев В.Е., Ерохин П.С., Осина Н.А. Применение методов спектроскопии для индикации и идентификации патогенных биологических агентов. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 2(108):68–71.
11. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. М.: Техносфера; 2007. 368 с.
12. Аюадурай С., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol.* 2010; 10:285.
13. Bader O., Weig M., Taverne-Ghadwal L., Lugert R., Cross U., Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17:1359–65.
14. Baena J.R., Lendl B. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004; 8:534–9.
15. Batoj S.M.A.B., Borgmann S., Flick K., Griffith J., Jones J.J., Saraswathi V., Hasty A.H., Kaiser P., Wilkins C.L. Lipid and Phospholipid Profiling of Biological Samples Using MALDI Fourier Transform Mass Spectrometry. *Lipids.* 2009; 44(4):367–71.
16. Bernardo K., Pakulat N., Fleer S., Schnaith A., Utermöhlen O., Krut O., Müller S., Krönke M. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(2):546–55.
17. Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P., Schrenzel J. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1169–75.
18. Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 36:380–407.
19. Fagerquist C.K., Sultan O. Top-Down Proteomic Identification of Furin-Cleaved  $\alpha$ -Subunit of Shiga Toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7 Using MALDI-TOF-TOF-MS/MS. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010:123460.
20. Ferreira L., Vega Castaño S.V., Sánchez-Juanes F., González-Cabrero S., Menegotto F., Orduña-Domingo A., González-Buitrago J.M., Muñoz-Bellido J.L. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures. *PLoS One.* 2010; 5(12):14235.
21. Gagnaire J., Dauwalder O., Boisset S., Khau D., Freydière A.-M., Ader F., Bes M., Lina G., Tristan A., Reverdy M.-E., Marchand A., Geissmann T., Benito Y., Durand G., Charrier J.-P., Etienne J., Welker M., van Belkum A., Vandenesch F. Detection of *Staphylococcus aureus* Delta-Toxin Production by Whole-Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry. *PLoS One.* 2012; 7(7):40660.
22. Gaunt P.S., Kalb S.R., Barr J.R. Detection of botulinum type E toxin in channel catfish with visceral toxicosis syndrome using catfish bioassay and endopep mass spectrometry. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007; 19:349–54.
23. Gidden J., Denson J., Liyanage R., Ivey D.M., Lay J.O. Lipid Compositions in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* During Growth as Determined by MALDI-TOF and TOF/TOF Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 2009; 283(1–3):178–84.
24. Gomes-Solecki M.J.C., Savitt A.G., Rowehl R., Glass J.D., Bliska J.B., Dattwyler R.J. LcrV Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Yersinia pestis* from Human Samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 12:339–46.
25. Harris L.G., El-Bouri K., Johnston S., Rees E., Frommelt L., Siemssen N., Christner M., Davies A.P., Rohde H., Macj D. Rapid identification of staphylococci from prosthetic joint infections using MALDI-TOF mass-spectrometry. *Int. J. Artif. Organs.* 2010; 33(9):568–74.
26. Hazen H.T., Martinez J.R., Chen Y., Lafon P.C., Garrett N.M., Parsons M.B., Bopp C.A., Sullards M.C., Sobecky P.A. Rapid Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *App. And Env. Microbiol.* 2009; 75(21):6745–56.
27. Jiang J., Parker C., Fuller J., Kawula T., Borchers C. An immunoaffinity tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for detection of *Francisella tularensis*. *Anal. Chim. Acta.* 2007; 605(1):70–9.
28. Kalb S.R., Moyra H., Boyer A.E., McWilliams L.G., Pirkle J.L., Barr J.R. The use of Endopep-MS for the detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F in serum and stool samples. *Anal. Biochem.* 2006; 351(1):84–92.
29. Kirpekar F., Nordhoff E., Larsen L.K., Kristiansen K., Roepstorff P., Hillenkamp F. DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Research.* 1998; 26(11):2554–9.
30. Kull S., Pauly D., Sturmman B., Kirchner S., Stämmler M., Dorner M.B., Lasch P., Naumann D., Dorner B.G. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2010; 82(7):2916–24.
31. Lambert P.J., Whitman A.G., Dyson O.F., Akula S.M. Raman spectroscopy: the gateway into tomorrow's virology. *Virology.* 2006; 3:51.
32. Lasch P., Beyer W., Nattermann H., Stämmler M., Siegbrecht E., Grunow R., Naumann D. Identification of *Bacillus anthracis* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Light Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(22):7229.
33. Lim D., Simpson J., Kearns E., Kramer M. Current and Developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(4):583–607.
34. Lista F., Reubsat F., De Santis R., Parchen R., de Jong A., Kieboom J., van der Laaken A., Voskamp-Visser I., Fillo S., Jansen H.-J., van der Plas J., Paauw A. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiology.* 2011; 11:267.
35. Mellmann A., Cloud J., Maier T., Keckevoet U., Ramminger I., Iwen P., Dunn J., Hall G., Wilson D., LaSala P., Kostrzewa M., Harmsen D. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(4):1946–54.
36. Nedelkov D., Nelson R.W. Detection of Staphylococcal Enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(9):5212–5.
37. Nordhoff E., Luebbert C., Thiele G., Haier V., Lehrach H. Rapid determination of short DNA sequences by the use of MALDI-MS. *Nucleic Acids Research.* 2000; 28(20):86.
38. Peruski A.H., Peruski L.F.Jr. Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):506–13.
39. Ryzhov V., Hathout Y., Fenselau C. Rapid Characterization of Spores of *Bacillus cereus* Group Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Appl. And Env. Microbiol.* 2000; 66(9):3828–34.
40. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Splettssoer W. Identification of *Francisella tularensis* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Light Mass Spectrometry: Fast, Reliable, Robust, and Cost-Effective Differentiation on Species and Subspecies Levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1061.
41. Schilling B., McLendon M., Phillips N., Apicella M., Gibson B. Characterization of Lipid A Acylation Patterns in *Francisella tularensis*, *F. novicida* and *F. philomiragia* using Multiple-Stage Mass Spectrometry ( $MS^n$ ) on a vMALDI Linear Ion Trap. *Anal. Chem.* 2007; 79(3):1034–42.
42. Schlosser G., Kačer P., Kuzma M., Szilágyi Z., Sorrentino A., Manzo C., Pizzano R., Malorni L., Pocsfalvi G. Coupling immunomagnetic separation on magnetic beads with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for detection of staphylococcal Enterotoxin B. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(21):6945–52.
43. Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P.E., Rolain J.M., Raoult G. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49:543–51.
44. Shields S.J., Oyeyemi O., Lighstone F.C., Balhorn R. Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes: confirmation of binding sites and changes in tertiary structure. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003; 14(5):460–70.
45. Silipo A., Lanzetta R., Amoresano A., Parrilli M., Molinaro A. Ammonium hydroxide hydrolysis: a valuable support in the MALDI-TOF mass spectrometry analysis of Lipid A fatty acid distribution. *J. Lipid Res.* 2002; 43(12):2188–95.
46. Tsilia V., Devreese B., de Baenst I., Mesuere B., Rajkovich A., Uyttendaele M., van de Vlede T., Heyndrickx M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 404(6–7):1691–702.
47. Usuki S., Pajaniappan M., Thompson S.A., Yu R.K. Chemical validation of molecular mimicry: interaction of cholera toxin with *Campylobacter* lipooligosaccharides. *Glycoconj. J.* 2007; 24(2–3):167–80.
48. van Veen S.Q., Claas E.C.J., Kuijper E.J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(3):900–7.
49. Zhang X., Yonzon C.R., van Duyne R.P. An electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy approach to anthrax detection. *Proc. SPIE.* 2003; 5221:82–91.
50. Zourob M., Elwary S., Turner A. Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Springer; 2008. 970 p.

References

- Vladimirov Yu.A., Litvin F.F. [Photobiology and Spectral Methods of Investigation. Workshop on General Physics]. Issue 8. M.: 1964. 211 p.
- Gridneva L.G., Musatov Yu.S., Gromova T.V., Pukhovskaya N.M., Belozerovala N.B., Utkina O.M., Ivanov L.I., Koval'sky A.G., Mironova L.V., Kulikalova E.S., Khunkheeva Zh.Yu., Balakhonov S.V. [Results of monitoring over and biological properties of *Vibrio cholerae* isolated from ambient environment objects in the Khabarovsk Territory]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 1:121-4.
- Dubrovsky Ya.A., Podol'skaya E.P. [Detection of peptide toxins using MALDI-MS (Review Article)]. *Nauchnoe Priborostroyeniye*. 2010; 20(4):21-35.
- Karnaikhova L.I., Tupitsyn E.N. [UV-spectroscopy of biological macromolecules. Study Guide]. Saratov; 2002. 15 p.
- Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Maslova I.P., Nakvi R.K., Solovchenko A.E., Klyachko-Gurvich G.L. [Light adsorption and light scattering spectra in cell suspensions of some cyanobacteria and microalgae]. *Fiziologiya Rastenii*. 2008; 55(3):464-70.
- Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., editors [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. M.; 2009. 472 p.
- Onishchenko G.G., editor [Guidelines on Specific Indication of Pathogenic Biological Agents]. M.: ZAO "MP Gigiena"; 2006. 288 p.
- [Chemist's Desk Reference. Vol. 4. Analytical Chemistry. Spectral Analysis. Refraction Index]. L.: Khimiya; 1967.
- [Modern Methods of Microbiological investigations. Study Guide for Higher Education Institutions]. Voronezh; 2007. 69 p.
- Utkin D.V., Kouklev V.E., Erokhin P.S., Ossina N.A. [Application of spectroscopy methods for indication and identification of pathogenic biological agents]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 2(108):68-71.
- Shmidt V. [Optic Spectroscopy for Chemists and Biologists]. M.: Tekhnosfera; 2007. 368 p.
- Ayyadurai S., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol.* 2010; 10:285.
- Bader O., Weig M., Taverne-Ghadwal L., Lugert R., Cross U., Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17:1359-65.
- Baena J.R., Lendl B. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004; 8:534-9.
- Batoy S.M.A.B., Borgmann S., Flick K., Griffith J., Jones J.J., Saraswathi V., Hasty A.H., Kaiser P., Wilkins C.L. Lipid and Phospholipid Profiling of Biological Samples Using MALDI Fourier Transform Mass Spectrometry. *Lipids*. 2009; 44(4):367-71.
- Bernardo K., Pakulat N., Fleer S., Schnaith A., Utermohlen O., Krut O., Müller S., Krönke M. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(2):546-55.
- Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P., Schrenzel J. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1169-75.
- Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 36:380-407.
- Fagerquist C.K., Sultan O. Top-Down Proteomic Identification of Furin-Cleaved  $\alpha$ -Subunit of Shiga Toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7 Using MALDI-TOF-TOF-MS/MS. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010:123460.
- Ferreira L., Vega Castaño S.V., Sánchez-Juanes F., González-Cabrero S., Menegotto F., Orduña-Domingo A., González-Buitrago J.M., Muñoz-Bellido J.L. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures. *PLoS One*. 2010; 5(12):14235.
- Gagnaire J., Dauwalder O., Boisset S., Khau D., Freydière A.-M., Ader F., Bes M., Lina G., Tristan A., Reverdy M.-E., Marchand A., Geissmann T., Benito Y., Durand G., Charrier J.-P., Etienne J., Welker M., van Belkum A., Vandenesch F. Detection of *Staphylococcus aureus* Delta-Toxin Production by Whole-Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry. *PLoS One*. 2012; 7(7):40660.
- Gaunt P.S., Kalb S.R., Barr J.R. Detection of botulinum type E toxin in channel catfish with visceral toxicosis syndrome using catfish bioassay and endopep mass spectrometry. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007; 19:349-54.
- Gidden J., Denson J., Liyanage R., Ivey D.M., Lay J.O. Lipid Compositions in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* During Growth as Determined by MALDI-TOF and TOF/TOF Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 2009; 283(1-3):178-84.
- Gomes-Solecki M.J.C., Savitt A.G., Rowehl R., Glass J.D., Bliska J.B., Dattwyler R.J. LcrV Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Yersinia pestis* from Human Samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 12:339-46.
- Harris L.G., El-Bouri K., Johnston S., Rees E., Frommelt L., Siemssen N., Christner M., Davies A.P., Rohde H., Macj D. Rapid identification of staphylococci from prosthetic joint infections using MALDI-TOF mass-spectrometry. *Int. J. Artif. Organs*. 2010; 33(9):568-74.
- Hazen H.T., Martinez J.R., Chen Y., Lafon P.C., Garrett N.M., Parsons M.B., Bopp C.A., Sullards M.C., Sobecky P.A. Rapid Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *App. And Env. Microbiol.* 2009; 75(21):6745-56.
- Jiang J., Parker C., Fuller J., Kawula T., Borchers C. An immunoaffinity tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for detection of *Francisella tularensis*. *Anal. Chim. Acta*. 2007; 605(1):70-9.
- Kalb S.R., Moyra H., Boyer A.E., McWilliams L.G., Pirkle J.L., Barr J.R. The use of Endopep-MS for the detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F in serum and stool samples. *Anal. Biochem.* 2006; 351(1):84-92.
- Kirpekar F., Nordhoff E., Larsen L.K., Kristiansen K., Roepstorff P., Hillenkamp F. DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Research*. 1998; 26(11):2554-9.
- Kull S., Pauly D., Sturmman B., Kirchner S., Stämmler M., Dorner M.B., Lasch P., Naumann D., Dorner B.G. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2010; 82(7):2916-24.
- Lambert P.J., Whitman A.G., Dyson O.F., Akula S.M. Raman spectroscopy: the gateway into tomorrow's virology. *Virology*. 2006; 3:51.
- Lasch P., Beyer W., Nattermann H., Stämmler M., Siegbrecht E., Grunow R., Naumann D. Identification of *Bacillus anthracis* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Light Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(22):7229.
- Lim D., Simpson J., Kearns E., Kramer M. Current and Developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(4):583-607.
- Lista F., Reubsaeft F., De Santis R., Parchen R., de Jong A., Kieboom J., van der Laaken A., Voskamp-Visser I., Fillo S., Jansen H.-J., van der Plas J., Paauw A. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiology*. 2011; 11:267.
- Mellmann A., Cloud J., Maier T., Keckevoet U., Ramminger I., Iwen P., Dunn J., Hall G., Wilson D., LaSala P., Kostrzewa M., Harmsen D. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(6):1946-54.
- Nedelkov D., Nelson R.W. Detection of Staphylococcal Enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(9):5212-5.
- Nordhoff E., Luebbert C., Thiele G., Haiser V., Lehrach H. Rapid determination of short DNA sequences by the use of MALDI-MS. *Nucleic Acids Research*. 2000; 28(20):86.
- Peruski A.H., Peruski L.F.Jr. Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):506-13.
- Ryzhov V., Hathout Y., Fenselau C. Rapid Characterization of Spores of *Bacillus cereus* Group Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Appl. And Env. Microbiol.* 2000; 66(9):3828-34.
- Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Splettstoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Light Mass Spectrometry: Fast, Reliable, Robust, and Cost-Effective Differentiation on Species and Subspecies Levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1061.
- Schilling B., McLendon M., Phillips N., Apicella M., Gibson B. Characterization of Lipid A Acylation Patterns in *Francisella tularensis*, *Fnoviciida* and *F.philomiragia* using Multiple-Stage Mass Spectrometry (MS) on a vMALDI Linear Ion Trap. *Anal. Chem.* 2007; 79(3):1034-42.
- Schlosser G., Kačer P., Kuzma M., Szilágyi Z., Sorrentino A., Manzo C., Pizzano R., Malorni L., Pocsfalvi G. Coupling immunomagnetic separation on magnetic beads with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for detection of staphylococcal Enterotoxin B. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(21):6945-52.
- Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P.E., Rolain J.M., Raoult G. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49:543-51.
- Shields S.J., Oyeyemi O., Lighthouse F.C., Balhorn R. Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes: confirmation of binding sites and changes in tertiary structure. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003; 14(5):460-70.
- Silipo A., Lanzetta R., Amoresano A., Parrilli M., Molinaro A. Ammonium hydroxide hydrolysis: a valuable support in the MALDI-TOF mass spectrometry analysis of Lipid A fatty acid distribution. *J. Lipid Res.* 2002; 43(12):2188-95.
- Tsilia V., Devreese B., de Baenst I., Mesuere B., Rajkovich A., Uyttendaele M., van de Vlede T., Heyndrickx M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 404(6-7):1691-702.
- Usuki S., Pajaniappan M., Thompson S.A., Yu R.K. Chemical validation of molecular mimicry: interaction of cholera toxin with Campylobacter lipooligosaccharides. *Glycoconj. J.* 2007; 24(2-3):167-80.
- van Veen S.Q., Claas E.C.J., Kuijper Ed J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(3):900-7.
- Zhang X., Yonzon C.R., van Duyn R.P. An electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy approach to anthrax detection. *Proc. SPIE*. 2003; 5221:82-91.
- Zourob M., Elwary S., Turner A. Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Springer; 2008. 970 p.

Authors:

Spitsyn A.N., Utkin D.V., Kouklev V.E., Portenko S.A., Germanchuk V.G., Osina N.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Шпцын А.Н., Уткин Д.В., Куклев В.Е., Портенко С.А., Германчук В.Г., Осина Н.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 15.04.14.