

**Выводы.** 1. Наиболее быстрым методом выявления *B. anthracis* в исследуемых пробах является метод ПЦР в режиме реального времени. Можно считать актуальными исследования по разработке более чувствительных ПЦР тест-систем и установления достаточности критерия диагноза сибирской язвы у людей на основании положительных результатов ПЦР, клинической картины и эпидемиологических данных, в отсутствие выделения культуры возбудителя.

2. Бактериологический и биологический методы дают возможность получить бесспорные доказательства этиологии заболевания и источника инфицирования людей.

3. Результаты MLVA-генотипирования по восьми хромосомным и двум плазмидным локусам с варибельным числом tandemных повторов оказывают существенную помощь в проведении эпидемиологического анализа вспышек заболевания сибирской язвой людей и животных.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки.*

#### ЛИТЕРАТУРА (п.4 см. REFERENCES)

1. Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Буравцева Н.П., Аксенова Л.Ю., Цыганкова О.И., Котенева Е.А. и др. Обзор ситуации по сибирской язве в Российской за 2013 г., прогноз на 2014 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; (2): 27—8.
2. Антоганов А.Н., Буравцева Н.П., Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Мезенцев В.М. и др. Сибирская язва в Ставропольском крае. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2012; 28 (4): 67—70.
3. Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Воропаев В.В. Сравнение эффективности использования мультиплексных тест-систем для обнаружения *Bacillus anthracis* в режиме «реального времени» на примере вспышки сибирской язвы в Ставропольском крае в 2013 г. В кн.: *Материалы региональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в При-*

*черноморском регионе»*. Ставрополь; 2013: 106—9. Available at: [http://snipchi.ru/updoc/Materiali%20konferentsii\\_Sbornik.pdf](http://snipchi.ru/updoc/Materiali%20konferentsii_Sbornik.pdf)

5. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Тюрин Е.А., Степанов А.В. и др. *Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение*. М.: ЗАО МП «ГИГИЕНА»; 2008.

Поступила 30.06.15

#### REFERENCES

1. Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Buravtseva N.P., Aksanova L.Yu., Tsygankova O.I., Koteneva E.A. et al. Overview of the anthrax in Russia for 2013, forecast for 2014. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2014; (2): 27—8. (in Russian)
2. Antyuganov A.N., Buravtseva N.P., Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Mezentsev V.M. et al. Anthrax in the Stavropol region. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2012; 28 (4): 67—70. (in Russian)
3. Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Eremenko E.I., Voropaev V.V. Comparison of the effectiveness of the use of multiplex test systems for the detection of *Bacillus anthracis* in «real time» on the example of anthrax outbreak in the Stavropol Territory in 2013. In: *Proceedings of the Regional Scientific-Practical Conference with International Participation «Topical Issues of Health and Disease in the Black Sea Region.» [Materialy regional'noy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhduнародным uchastiem «Aktual'nye voprosy obespecheniya sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya v Prichernomorskoy regione»]*. Stavropol'; 2013: 106—9. Available et: [http://snipchi.ru/updoc/Materiali%20konferentsii\\_Sbornik.pdf](http://snipchi.ru/updoc/Materiali%20konferentsii_Sbornik.pdf) (in Russian)
4. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2000; 182 (10): 2928—36.
5. Marinin L.I., Onishchenko G.G., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Tyurin E.A., Stepanov A.V. et al. *Human Anthrax: Epidemiology, Prevention, Diagnosis and Treatment [Sibirskaya yazva cheloveka: epidemiologiya, profilaktika, diagnostika, lechenie]*. Moscow: ЗАО МП «ГИГИЕНА»; 2008. (in Russian)

Received 30.06.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 579.871.1.083.18

Харсеева Г.Г.<sup>1</sup>, Воронина Н.А.<sup>1</sup>, Миронов А.Ю.<sup>2</sup>

### МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ *CORYNEBACTERIUM NON DIPHTHERIAE*

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет», 344022, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФБУН «МНИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Российская Федерация

Правильную идентификацию *Corynebacterium non diphtheriae* осложняет их большое видовое разнообразие, варибельная биохимическая активность, а также, с одной стороны, широкий спектр заболеваний, при которых они выделяются, с другой — их присутствие в составе нормальной микрофлоры человека. Бактериологический метод является традиционной основой идентификации коринебактерий, но длителен (7—14 дней), дает неоднозначные результаты при культивировании липофильных и биохимически варибельных видов. Для окончательной идентификации трудно определяемых видов *C. non diphtheriae* рекомендуется проводить молекулярно-генетическое исследование с помощью золотого стандарта — секвенирования по 16S рРНК (ДНК), генам *groB* и *PLD*. При получении неоднозначных ответов секвенирования по 16S рРНК точная идентификация достигается путем секвенирования второстепенного гена *groB*, что позволяет обнаружить уникальные различия в последовательностях геномов у разных видов коринебактерий (наличие генов вирулентности; отсутствие кластера генов, ответственных за продукцию ряда сахаролитических ферментов; наличие генов, кодирующих синтез определенных пигментов, и др.). Масс-спектрометрический метод (MALDI-ToF-MS), применяемый для скрининговой идентификации *Corynebacterium*, прост в исполнении, но требует совершенствования для более точной дифференциации близкородственных видов. Необходим полифазный подход к идентификации *C. non diphtheriae*, включающий хемотаксономическую, фенотипическую, генотипическую информацию, необходимую для достоверного описания новых клинически значимых видов коринебактерий.

Ключевые слова: *Corynebacterium non diphtheriae*; бактериологический метод; молекулярно-генетический метод; MALDI-ToF-MS.

Для корреспонденции: Харсеева Галина Георгиевна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет», 344022, Ростов-на-Дону, E-mail: [galinagh@bk.ru](mailto:galinagh@bk.ru)

**Для цитирования:** Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Миронов А.Ю. Методы идентификации *Corynebacterium non diphtheriae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (4): 245-249. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-4-245-249  
Kharseeva G.G.<sup>1</sup>, Voronina N.A.<sup>1</sup>, Mironov A.Yu.<sup>2</sup>

THE METHODS OF IDENTIFICATION OF CORYNEBACTERIUM NON DIPHTHERIAE

<sup>1</sup>The Rostovskii state medical university, 344022 Rostov-on-Don, Russia; <sup>2</sup>G.N. Gabrichevskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor, 125212 Moscow, Russia

*The proper identification of Corynebacterium non diphtheriae is complicated by their wide species variety, variable biochemical activity, large spectrum of diseases at which they are isolated and also by their presence in normal human micro-flora. The bacteriological method is a traditional basis for identification of corynebacteria though long (7-14 days), produces ambiguous results at cultivation of lipophilic and biochemically variable species. For final identification of nondescript species of Corynebacterium non diphtheriae it is recommended to carry out molecular genetic study using golden standard - sequencing on 16S pRNA (DNA), genes rpoB and PLD. In case of receiving of ambiguous responses of sequencing on 16S pRNA precise identification is achieved by sequencing of secondary gene rpoB that permits discovering unique differences in sequences of genomes in different species of corynebacteria (presence of genes of virulence; absence of cluster of genes responsible for production of number of saccharolytic enzymes; presence of genes coding synthesis of particular pigments, etc.). The mass-spectrometric analysis (MALDI-ToF-MS) applied for screening identification of Corynebacterium, is simple in implementation, though requires further development for more accurate differentiation of closely-related species. The poly-phase approach to identification of Corynebacterium non diphtheriae is needed which is to include chemotaxonomic, phenotypic, genotypic information required for reliable description of new clinically significant species of corynebacteria.*

**Key words:** *Corynebacterium non diphtheriae*; bacteriologic method; molecular genetic method; MALDI-ToF-MS.

**For citation:** Kharseeva G.G., Voronina N.A., Mironov A.Yu. The methods of identification of *Corynebacterium non diphtheriae*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (4): 245-249. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-245-249.

For correspondence: Kharseeva G.G., doctor of medical sciences, professor, head of chair of microbiology and virology e-mail: vn\_titov@mail.ru

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Financing.** The study had no sponsor support.

Received 14.12.2015  
Accepted 15.12.2015

Обнаружение коринебактерий в клиническом материале, как правило, объясняется контаминацией, причем учет частоты их выделения в бактериологических лабораториях не предусмотрен. *Corynebacterium non diphtheriae* выделяют от пациентов с острыми заболеваниями верхних дыхательных путей (10—15%), гнойно-септическими процессами, патологией урогенитального тракта (61,1—70,0%), кожи и др. [1—3]. Коринебактерии могут оказаться в любом материале, взятом для диагностического исследования — гное, мокроте, моче, отделяемом конъюнктивы, носоглотки, носовых пазух, пунктатах костного мозга, лимфатических узлов, крови, спинно-мозговой жидкости и др. [4]. Коринебактерии рассматривают как этиологически значимые в том случае, если они выделяются из стерильных полостей организма, высеваются из нестерильных полостей в количестве  $1 \cdot 10^4$  (в монокультуре) и  $1 \cdot 10^5$  (в микстах), а также при повторном выделении<sup>1</sup>. *C. non diphtheriae* входят в состав нормальной микрофлоры организма человека, поэтому необходимо принимать во внимание, что при выделении их одновременно с пораженных зон и других биотопов они могут играть роль в развитии заболевания [5, 6].

В настоящее время описано 88 видов коринебактерий, 67 из которых имеют клиническое значение [6]. Правильную идентификацию *C. non diphtheriae* и установление их клинической значимости серьезно осложняют следующие причины: большое видовое разнообразие *C. non diphtheriae*; широкий спектр заболеваний, при которых они выделяются; переменная биохимическая активность многих видов, а также то, что коринебактерии входят в состав нормальной микрофлоры организма человека.

Традиционно основой идентификации *C. non diphtheriae* является метаболический профиль. Выявление фенотипических особенностей коринебактерий проводится культуральным методом на основе определения их ферментативной и окислительной активности, наличие или отсутствие которой определяется на питательных средах или с использованием тест-систем для идентификации<sup>1</sup> [6, 7]. Использование дифференциально-диагностических сред — «пробирочных» тестов для определения гидролиза сахаров, крахмала, наличия нитратредуктазы, фосфатазы, цистиназы, пиразинамидазы, уреазы, тирозиназы эффективно для видов *C. non diphtheriae*, медленно разлагающих сахара или требующих добавки липидов [6, 8, 9]. Многие из этих тестов характеризуются достаточно высокой воспроизводимостью, точностью, быстротой выполнения, приемлемой стоимостью, доступностью для практических лабораторий. Эти тесты незаменимы, когда идет проверка диагностической эффективности новых тест-систем.

Бактериологический метод исследования с применением «пробирочных» тестов, особенно для медленно растущих видов коринебактерий, может занимать от 7 до 14 дней и давать неоднозначные результаты, что является главным и существенным недостатком. Липофильные виды коринебактерий могут плохо расти на питательных средах, давать ложные результаты при фенотипической идентификации, что затрудняет установление их видовой принадлежности.

Биохимическое тестирование может выполняться и с использованием коммерческих тест-систем для идентификации *Corynebacterium spp.* и некоторых коринеформных бактерий. Результаты учитывают визуально или с помощью автоматических анализаторов, содержащих базы данных для характеристики этих бактерий [6, 10, 11]. Данный метод требует много времени (не менее 16 ч для обработки результатов после выделения подозрительных колоний) и не всегда дает надежную информацию на видовом уровне [12].

<sup>1</sup>МР 4.2.00.20-11. Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium* (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 21.03.11, М.; 2011. 55 с.).

Существуют определенные ограничения по использованию фенотипического тестирования в качестве единственного метода идентификации. Ограниченное количество субстратов в панелях тест-систем не обеспечивает определение достаточного набора биохимических признаков, отличающих соответствующие виды. Это усугубляется для тех видов бактерий, которые являются метаболически неактивными, имеют замедленный рост, являются близкородственными (например, *C. amycolatum* и *C. xerosis*) [6, 9]. Необходимо учитывать, что фенотипические признаки коринебактерий могут изменяться под воздействием антибактериальных препаратов [13]. Стоимость тест-систем для идентификации возрастает с увеличением числа субстратов, присутствующих в панели. Лежащие в основе тест-систем базы данных обновляются редко, что затрудняет идентификацию.

Фенотипическое тестирование в качестве единственного подхода к идентификации может быть удовлетворительным для обычных видов рода *Corynebacterium*, которые хорошо растут в течение 24—48 ч и являются биохимически активными по отношению к субстратам, находящимся в обычно используемых тест-системах. Для окончательной идентификации трудноопределяемых видов *C. non diphtheriae* рекомендуется проводить молекулярно-биологические исследования [6, 9].

Золотым стандартом идентификации признан метод гено-инженерного анализа — секвенирование по 16S рРНК (ДНК), генам *rpoB* и *PLD* [13]. При этом 16S рРНК (ДНК), *rpoB*- и *PLD*-гены используются в качестве молекулярных маркеров (мишеней) бактерий [14].

Секвенирование по 16S рРНК позволяет выявить различия в последовательностях генов у большинства видов рода *Corynebacterium*, отличающихся на 1,3% или с большей дисперсией (при сравнении последовательности всего гена), а также величину критерия идентичности > 98,7% для представителей одного вида [15]. Исключения составляют следующие виды рода *Corynebacterium* с уровнем дисперсии ≤ 2% друг к другу: *C. afermentans*, *C. coyleae*, *C. mucifaciens* (< 2%); *C. aurimucosum*, *C. minutissimum*, *C. singulare* (< 2%); *C. sundsvallense*, *C. thomssenii* (< 1,5%); *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* (< 1% друг к другу и < 2% к *C. diphtheriae*); *C. propinquum*, *C. pseudodiphtheriticum* (< 2%); *C. xerosis*, *C. freneyi*, *C. hansenii* (< 2%), *C. macginleyi*, *C. accolens* (< 2%) [6].

Установлено, что у микроорганизмов часто встречаются множественные копии гена 16S рРНК. Последовательности этих внутригеномных копий могут различаться между собой для одного микроорганизма [14]. Обусловленный этим высокий внутривидовой полиморфизм генов 16S рРНК затрудняет идентификацию. При сравнительном анализе последовательности генов 16S рРНК процент гомологии между штаммами *C. coyleae*, *C. afermentans*, *C. mucifaciens* составляет 97,7—98,5% [16], штаммами *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* — 98,5%, *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* — 98,5%, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* — 99,7% [13].

Окончательная и более точная идентификация может быть проведена путем секвенирования второстепенного гена *rpoB*, если секвенирование 16S рРНК дает неоднозначные ответы. Частичное или полное секвенирование гена *rpoB* как универсального для филогенетического анализа и различия близкородственных видов является наиболее широко используемым подходом для межвидовой характеристики коринебактерий [6, 17]. Выявление последовательности гипервариабельной области гена *rpoB* позволяет идентифицировать неизвестные микроорганизмы в исследуемом материале, что является несомненным преимуществом данного подхода [13]. Степень идентичности генетической последовательности при секвенировании гипервариабельной области *rpoB* заметно ниже и составляет между штаммами *C. ulcerans* и *C.*

*pseudotuberculosis* 93,6%, а между *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* 86,0%. [13, 16].

Большим преимуществом молекулярно-генетических методов исследования является обнаружение уникальных различий в последовательностях геномов у различных видов коринебактерий: наличие генов вирулентности, ответственных за синтез нейраминидазы и *PLD* у *C. pseudotuberculosis* и *C. ulcerans*; отсутствие кластера генов, ответственных за продукцию некоторых сахаролитических ферментов; наличие генов, кодирующих синтез черного пигмента у *C. aurimucosum*, защищающего от высоких концентраций перекиси водорода в организме; наличие локуса уреазы у *C. urealyticum* и *C. riegelii* [6].

Совместное использование мультиплексной ПЦР, осуществляющей секвенирование по 16S рРНК, *rpoB*- и *PLD*-генам, позволяет дифференцировать такие виды, как *C. pseudotuberculosis* и *C. ulcerans* [13, 16]. Несмотря на то что секвенирование генов по 16S рРНК и гену *rpoB* дают сходные результаты, для обнаружения *rpoB* не требуется секвенирования всего генома, что более трудоемко и может занимать до нескольких дней.

Сведения о геномных последовательностях 16S рРНК коринеформных бактерий занесены и хранятся в международных базах данных, таких как GenBank. На сегодняшний день доступны многочисленные последовательности генома не только для *C. diphtheriae*, но и недифтерийных бактерий, в том числе *C. aurimucosum*, *C. bovis*, *C. jeikeium*, *C. kroppenstedtii*, нескольких штаммов *C. pseudotuberculosis*, *C. resistens*, двух штаммов *C. ulcerans*, *C. urealyticum*, *C. variable* [6, 16].

Использование сложных, дорогостоящих, требующих специально подготовленного персонала молекулярно-генетических методов исследований доступно ограниченному числу лабораторий, что создает сложности при идентификации коринебактерий [13].

В последние годы для быстрой идентификации микроорганизмов, в том числе и *C. non diphtheriae*, в лабораторной практике внедряется масс-спектрометрический анализ (MALDI-ToF-MS), позволяющий определить специфический для каждого вида микроорганизмов масс-спектр рибосомальных белков [6, 12, 18, 19].

Масс-спектрометрический метод (MALDI-ToF-MS) позволяет идентифицировать род *Corynebacterium* на уровне видов и может широко применяться как быстрый скрининговый метод, в том числе для обнаружения токсигенных штаммов коринебактерий [19, 20]. В ходе данного метода белки, высвобождаемые из бактерий, ионизируются и детектируются масс-спектрометром (MS), в котором анализируется спектр белков [21]. Процесс автоматизирован (после калибровки прибора), масс-спектры изолята генерируются и сравниваются с базой данных референтного спектра. Программа сопоставляет спектр исследуемого изолята с известными спектрами в библиотеке данных, фиксируя перечень возможных микроорганизмов (ранжированных по шкале или в процентах) и оценивая уровень достоверности идентификации. Далее определяется коэффициент совпадения (Score Value). Результаты идентификации со значением коэффициента Score 1 2,0 считаются достоверными на уровне вида, от 1,999 до 1,700 — на уровне рода; < 1,700 свидетельствует о ненадежной идентификации. Метод MALDI-ToF-MS полезен для применения в клинической микробиологии за счет сочетания мощных аналитических возможностей и хорошо составленной базы данных о спектрах микроорганизмов. Доступны две коммерческие системы (включающие коммерческие базы данных) — Bruker Biotyper (Bruker Daltonics) с использованием программного обеспечения Flex-control для идентификации штаммов рода *Corynebacterium* и VITEK®

MS (bioMerieux) [6, 12, 22, 23]. Одиночные и множественные изоляты могут быть исследованы одновременно. Сроки идентификации сокращаются при этом на 24—72 ч, а аналитическое время оборота теста составляет  $\leq 3$  мин на изолят. Технология, за редкими исключениями, не применяется непосредственно к клиническим образцам — микроорганизмы должны предварительно быть выращены на питательной среде и пока еще сохраняется необходимость подготовительной обработки. Для проведения исследования требуется мало расходных материалов и реагентов, не требуется серьезной и длительной подготовки методики. Данная технология обладает низкой стоимостью расходных материалов без учета стоимости прибора MALDI-ToF-MS [6, 20, 23, 24].

При сравнении результатов видовой идентификации *C. non diphtheriae* масс-спектрометрическим методом с золотым стандартом (секвенированием по 16S рПНК) 57—87% изолятов определялись точно. Исключение составили *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, которые MALDI-ToF-MS определил как генетически близкородственные виды *C. minutissimum* и *C. propinquum* соответственно [12, 19, 21, 25]. Большинство из указанных штаммов (около 70%) имели при MALDI-TOF-MS индекс Score 1,2,0 [19, 21, 25].

В применении MALDI-ToF-MS к идентификации *C. non diphtheriae* существует ряд ограничений. Во-первых, MALDI-ToF-MS позволяет определять только известные виды коринебактерий, что является существенным недостатком в случае выделения новых видов. Во-вторых, необходимо учитывать существование близкородственных видов коринебактерий, таких как *C. propinquum* и *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum* и *C. minutissimum*, различия между которыми позволяют выявить только молекулярно-генетические методы исследования [6]. В-третьих, результаты масс-спектрометрического анализа для достоверности необходимо подтверждать основными фенотипическими и биохимическими характеристиками исследуемых видов (морфология колоний, тест на оксидазу, гемолитические свойства, темпы роста, другие дополнительные тесты) [26]. В-четвертых, причиной ошибки при идентификации методом MALDI-ToF-MS может служить то, что точечные или слизистые колонии содержат недостаточное количество белка для получения идеального спектра [22]. Метод MALDI-ToF-MS может дополнять традиционные фенотипические методы идентификации коринебактерий, введенные в базу данных [25]. В то же время метод MALDI-ToF-MS требует дальнейшего совершенствования для определения более широкого спектра представителей рода *Corynebacterium*.

В настоящее время необходим комплексный подход к идентификации *C. non diphtheriae*, который включает в себя хемотаксономическую, фенотипическую, генотипическую информацию, необходимую для достоверного описания новых клинически значимых видов коринебактерий.

*Исследование не имело спонсорской поддержки.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—3, 6, 8, 10—18, 20, 22—24, 26 см. REFERENCES)

1. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., ред. *Руководство по медицинской микробиологии. Книга 3. Том 1. Опортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика*. М.: Бином; 2013.
2. Анохин В.А., Халиуллина С.В., Назарова О.А., Хаертынов Х.С. Случай раннего неонатального сепсиса, обусловленного *C. Amycolatum*. *Практическая медицина*. 2012; (7): 178—80.
3. Харсеева Г.Г., ред. *Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты*. М.: Практическая медицина; 2014.
4. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Миронов А.Ю., Алутина Э.Л. Сравнительный анализ методов идентификации *Corynebacterium non diphtheriae*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; (12): 43—6.
5. Миронов А.Ю., Зур Н.В. *Молекулярные маркеры патогенов*. М.: Издательство ООО «Тираж»; 2013.

21. Патель Р. MALDI-ToF масс-спектрометрия: трансформативная протеомика для клинической микробиологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; (11): 8—10.
22. Сиволодский Е.П., Зуева Е.В., Кунилова Е.С., Богумильчик Е.А., Домакова Т.В. Идентификация клинических штаммов *Pseudomonas* методами MALDI-ToF масс-спектрометрии и традиционных исследований. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; (1): 46—9.

Поступила 14.12.15

## REFERENCES

1. Coyle M.B., Lipsky B.A. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990; 3 (3): 227—46.
2. Knox K., Nolmes A. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other non diphtheriae *Corynebacterium*. *J. Emerg. Inf. Dis.* 2002; 8 (1): 97—9.
3. Reddy B.S., Chaudhury A., Kalawat U., Jayaprada R., Reddy G., Ramana B.V. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacterium* (Diphtheroids). *Indian J. Med. Microbiol.* 2012; 30 (1): 52—7.
4. Labinskaya A.S., Kostyukova N.N., eds. *Guidelines for Medical Microbiology. Book 3. Volume 1. Opportunistic Infections: Pathogen and Etiology Diagnosis [Rukovodstvo po meditsinskoy mikrobiologii. Kniga 3. Tom 1. Opportunisticheskie infektsii: vozбудiteli i etiologicheskaya diagnostika]*. Moscow: Binom; 2013. (in Russian)
5. Anokhin V.A., Khaliullina S.V., Nazarova O.A., Khaertynov Kh.S. The case of early neonatal sepsis *S. Amycolatum*. *Prakticheskaya meditsina*. 2012; (7): 178—80. (in Russian)
6. Bernard K.A. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50 (10): 3152—8.
7. Kharseeva G.G., ed. *Diphtheriae: Microbiological and Immunological Aspects [Difteriya: mikrobiologicheskie i immunologicheskie aspekty]*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2014. (in Russian)
8. Bernard K.A. *Corynebacterium* species and coryneforms: an update on taxonomy and diseases attributed to these taxa. *Clin. Microbiol. Newsl.* 2005; 27 (2): 9—18.
9. Kharseeva G.G., Voronina N.A., Mironov A.Yu., Alutina E.L. Comparative analysis of identification methods of *Corynebacterium non diphtheriae*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; (12): 43—6. (in Russian)
10. Rennie R.P., Brosnikoff C., Turnbull L., Reller L.B., Mirrett S., Janda W. et al. Multicenter evaluation of the Vitek 2 anaerobe and *Corynebacterium* identification card. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (8): 2646—51.
11. Fernandez-Natal M.I., Saez-Nieto J.A., Valdezate S., Rodriguez-Pollan R.H., Lapena S., Cachon F. et al. Isolation of *Corynebacterium ureiceleivorans* from normally sterile sites in humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2009; 28 (6): 677—81.
12. Vila J., Juiz P., Salas C., Almela M., Garcia de la Fuente C., Zboromyrska Y. et al. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50 (5): 1745—7.
13. Venezia J., Cassidy P.K., Marani R.P., Shen Z., Buckley E.M., Peters Y. et al. Characterization of *Corynebacterium* species in macaques. *J. Med. Microb.* 2012; 61 (10): 1401—8.
14. Case R.J., Boucher Y., Dahllöf I., Holmström C., Doolittle W.F., Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73 (1): 278—88.
15. Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*. 2006; 33: 152—5.
16. Bernard K.A., Munro C., Wiebe D. Characteristics of rare or recently described *Corynebacterium* species recovered from human clinical material in Canada. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40 (11): 4375—81.
17. Khamis A., Raoult D., La Scola B. RpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (9): 3925—31.
18. Welker M. Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics*. 2011; 11 (15): 3143—53.
19. Mironov A.Yu., Zur N.V. *Molecular Markers of Pathogens [Molekul'yarnye markery patogenov]*. Moscow: Izdatel'stvo OOO «Tirazh»; 2013. (in Russian)
20. Konrad R., Berger A., Huber I., Boschert V., Hörmansdorfer S., Busch U. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-ToF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. *Euro Surveill.* 2010; 15 (43): 1—5.
21. Patel R. MALDI-ToF mass spectrometry: transformative proteomics to clinical microbiology. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; (11): 8—10. (in Russian)
22. Alatoom A.A., Cazanave C.J., Cunningham S.A., Inde S.M., Patel R. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50 (1): 160—3.

23. Patel R. MALDI-TOF-mass-spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology. *Clin. Chem.* 2013; 59 (2): 340—2.
24. Gaillot O., Blondiaux N., Loiez C., Wallet F., Lemaître N., Herwegh S. et al. Cost-effectiveness of switch to matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine bacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49 (12): 4412.
25. Sivolodskiy E.P., Zueva E.V., Kunilova E.S., Bogumil'chik E.A., Domakova T.V. Identification of strains *Pseudomonas Fulva* clinical techniques MALDI-ToF mass spectrometry and conventional studies. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2015; (1): 46—9. (in Russian)
26. Kawasaki Y., Matsubara K., Ishihara H., Nigami H., Iwata A., Kawaguchi K. et al. *Corynebacterium propinquum* as the first cause of infective endocarditis in childhood. *J. Infect. Chemother.* 2014; 20 (5): 317—9.

Received 14.12.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.3-022.7-073.524.325

Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А.

## ВОЗМОЖНОСТИ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ В МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, 119991 Москва, Российская Федерация

*Обзор литературы посвящен анализу возможностей, недостатков и перспектив важной прикладной технологии, которая стремительно внедряется в медицинскую микробиологию, — масс-спектрометрии (МС). Главным достижением МС является быстрая и надежная идентификация большинства актуальных для медицины видов микробов, производимая не только из чистых культур, но и из биологического материала. Существуют лишь единичные таксономические группы, представители которых недостоверно идентифицируются при помощи МС. Приводятся примеры методов внутривидового определения клинически/эпидемиологически значимых штаммов и оценки их свойств, включая вирулентность и резистентность. Перспективы МС связаны с внедрением в микробиологическую практику способов оценки вирулентности, резистентности и типирования. Главные проблемы микробиологической МС заключаются в несовершенстве идентификации микроорганизмов в смешанных культурах (включая биологический материал) и отсутствии стандартных критериев в оценке антибиотикорезистентности микробов.*

**Ключевые слова:** масс-спектрометрия; микробиологическая диагностика; идентификация; резистентность; типирование; вирулентность.

**Для цитирования:** Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Возможности, проблемы и перспективы масс-спектрометрических технологий в медицинской микробиологии (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61 (4): 249-256

DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-4-249-256

Bocharova Yu.A., Chebotar I.V., Mayanskii N.A.

THE POSSIBILITIES, PROBLEMS AND PERSPECTIVES OF MASS-SPECTROMETRY IN MEDICAL MICROBIOLOGY: PUBLICATIONS REVIEW

The research center of children health of Minzdrav of Russia, 119991 Moscow, Russia

*The publications review deals with analysis of possibilities, shortcomings and perspectives of mass-spectrometry - important applied technology that is headlong introduced in medical microbiology. The main achievement of mass-spectrometry is fast and valid identification of most species of microbes actual for medicine both in pure growths and biologic samples. There are only single taxonomic which representatives are identified unreliably in case of using of mass-spectrometry. The examples are given concerning methods of intraspecific identification of clinically/epidemiologically significant strains and evaluation of their characteristics, including virulence and resistance. The perspectives of mass-spectrometry are related to implementation into microbiological practice the modes of evaluation of virulence, resistance and identification of microorganisms in mixed cultures (including biological samples) and absence of standard criteria in evaluation of antibiotic resistance of microbes.*

**Key words:** mass-spectrometry; microbiological diagnostic; identification; typing; virulence

**For citation:** Bocharova Yu.A., Chebotar I.V., Mayanskii N.A. The possibilities, problems and perspectives of mass-spectrometry in medical microbiology: publications review. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (4): 249-256. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-249-256

**For correspondence:** Chebotar I.V., doctor of medical sciences, leading researcher of laboratory of microbiology. e-mail: nizarnn@yandex.ru

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Financing.** The study was carried out with financial support of Minobrnauka of Russia (agreement № 14.607.21.0064, unique identifier of applied scientific studies RFMEFI 60714x0064)

Received 10.12.2015  
Accepted 15.12.2015

Для корреспонденции: Чеботарь Игорь Викторович, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, электронная почта: nizarnn@yandex.ru