

6. Гайдышев И.П. *Анализ и обработка данных: специальный справочник*. СПб.; 2001.
8. Белоусова О.Ю. Дисбактериоз кишечника как фактор риска развития хронических заболеваний кишечника у детей. *Здоровье ребенка*. 2011; (1). Available at: <http://www.mif-ua.com/archive/gazeta-novosti-meditsiny-i-farmatsii>. (дата обращения 15 января 2015).
9. Ракова Е.Б. *Современная структура кишечного микробиоценоза у детей Иркутской области*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Иркутск; 2010.
10. Захарова Ю.В. Биологические свойства бифидобактерий в ассоциативном симбиозе толстой кишки. *Медицина в Кузбассе*. 2010; (1): 14—6.
14. Макарова С.Г., Боровик Т.Э., Балаболкин И.И., Катосова Л.И., Лукоянова О.Л., Семенова Н.Н. и др. Современный взгляд на роль кишечного биоценоза при пищевой аллергии у детей и подходы к его коррекции. *Вопросы современной педиатрии*. 2012; (5): 36—45.
15. Корниенко Е.А. Роль кишечной микробиоты в развитии целиакии. *Медицинский совет*. 2013; (1): 44—51.
16. Васечкина Л.И., Тюрина Т.К. Функциональные нарушения органов пищеварения у детей — алгоритмы диагностики и подходы к лечению. *Альманах клинической медицины*. 2012; (27): 3—7.
17. Орлова Н.А. *Дисбиоз кишечника у больных воспалительными заболеваниями кишечника с сочетанной патологией и/или внекишечными проявлениями*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. СПб.; 2010.
- dovaniya v klinike. *Spravochnik*. Moscow: Meditsina; 1987: 240. (in Russian)
5. Kozlovskaya L.V., Martynova M.A. *Study Guide for Clinical Laboratory Methods [Uchebnoe posobie po klinicheskim laboratornym metodam issledovaniya]*. Moscow: Meditsina; 1975. (in Russian)
6. Gaydyshev I.P. *Analysis and Data Processing: Special Guide [Analiz i obrabotka dannykh: spetsial'nyy spravochnik]*. St.Petersburg: 2001. (in Russian)
7. Bern C., Martines J. The magnitude of the global problem of diarrheal disease. *Vale J. Biol. Med.* 1988; 51: 505—12.
8. Belousova O.Yu. Dysbacteriosis of the intestine as a risk factor for development of chronic intestinal diseases in children. *Zdorov'e rebenka*. 2011; (1). Available at: <http://www.mif-ua.com/archive/gazeta-novosti-meditsiny-i-farmatsii>. (accessed 15 January 2015) (in Russian)
9. Rakova E.B. *The Modern Structure of the Intestinal Microbiota in the Pediatric Population of the Irkutsk Region*: Diss. Irkutsk; 2010. (in Russian)
10. Zakharova Yu.V. Biological properties of bifidobacteria in associative symbiosis colon. *Meditsina v Kuzbasse*. 2010; (1): 14—6. (in Russian)
11. Huycke M.M., Gaskins H.R. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2004; 229 (7): 586—97.
12. Isolauri E., Kalliomaki M., Laitinen K., Salminen S. Modulation of the maturing gut barrier and microbiota: a novel target in allergic disease. *Curr. Pharm. Des.* 2008; 14 (14): 1368—75.
13. Proal A.D., Albert P.J., Marshall T. Autoimmune disease in the era of the metagenome. *Autoimmun. Rev.* 2009; 8 (8): 677—81.
14. Makarova S.G., Bоровик T.E., Balabolkin I.I., Katosova L.I., Lukoyanova O.L., Semenova N.N. et al. The modern view of the role of intestinal biocenosis with food allergies in children and the approaches to its correction. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2012; (5): 36—45. (in Russian)
15. Kornienko E.A. The role of the intestinal microbiota in the development of celiac disease. *Meditsinskiy sovet*. 2013; (1): 44—51. (in Russian)
16. Vasechkina L.I., Tyurina T.K. Functional disorders of the digestive system in children: diagnostic and treatment approaches. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2012; (27): 3—7. (in Russian)
17. Orlova N.A. *Intestinal Dysbiosis in Patients with Inflammatory Bowel Disease with Comorbidity and/or Extraintestinal Manifestations*: Diss. St. Petersburg; 2010. (in Russian)

Поступила 02.09.15

REFERENCES

1. Bukharin O.V., Usvyatsov B.Ya., Khlopko Yu.A. Medical and environmental aspects of microsymbionts person. *Ekologiya cheloveka*. 2010; (8): 28—31. (in Russian)
2. Gastrointestinal disease and nutrition problems in children. Available at: <http://medi.ru/>. (accessed 15 January 2015). (in Russian)
3. Kolesnikova L.I., Dolgikh V.V., Polyakov V.M., Rychkova L.V. *Problems of Psychosomatic Diseases of Childhood [Problemy psikhosomaticheskoy patologii detskogo vozrasta]*. Novosibirsk: Nauka; 2005. (in Russian)
4. Men'shikov V.V., Delektorskaya L.N., Zolotnitskaya R.P., Andreeva Z.M., Ankirskaya A.S., Balakhovskiy I.S. et al. *Chemical and microscopic methods to study biological materials*. In: Men'shikov V.V., ed. *Handbook of Laboratory Research to the Clinic [Laboratornyye issle-*

Received 02.09.15

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 579.842.11.083.1:543.42.062

Гапон М.Н.¹, Телесманич Н.Р.², Терновская Л.Н.¹, Чайка С.О.², Чайка И.А.², Микашинович З.И.², Твердохлебова Т.И.¹

ВРЕМЯПРОЛЕТНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ВНУТРИВИДОВАЯ ДИАГНОСТИКА ШТАММОВ ЭШЕРИХИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЧЕЛОВЕКА

¹ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, 344000, Россия;

²ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра общей и клинической биохимии № 1, г. Ростов-на-Дону, 344022, Россия

*Цель. Времяпролетный масс-спектрометрический анализ свежесвыделенных от человека популяций кишечной палочки для идентификации маркеров протеома, характерных для гемолитических и негемолитических штаммов, эшерихий — ассоциантов условно патогенных энтеробактерий. Материалы и методы. 20 штаммов монопопуляции гемолитических эшерихий; 100 штаммов монопопуляции негемолитических эшерихий; 15 негемолитических штаммов, выделенных из ассоциации с условно патогенными энтеробактериями. Белковое профилирование на масс-спектрометре MALDI-TOF MS Autoflex «Bruker Daltonik». Результаты. Значение внутри вида масс-заряда пика со 100% интенсивностью, равного 9000 Да, может служить дифференциальным признаком выявления гемолитических эшерихий при масс-спектрометрическом биотипировании. Заключение. Даны протеомные характеристики штаммов разных популяций внутри вида *Escherichia coli*; установлены таксон-специфические маркеры для протеомной дифференциации популяции эшерихий.*

Ключевые слова: эшерихии; масс-спектрометрия; масс-пик-лист; биотипирование; скор.

Для корреспонденции: Гапон Марина Николаевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории санитарной микробиологии водных объектов и микробной экологии человека ФБУН «Ростов НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, 344000, г. Ростов-на-Дону, e-mail: marina.gapon@mail.ru

Для цитирования: Гапон М.Н., Телесманич Н.Р., Терновская Л.Н., Чайка С.О., Чайка И.А., Микашинович З.И., Твердохлебова Т.И. Времяпролетная масс-спектрометрическая внутривидовая диагностика штаммов эшерихий, выделенных от человека. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (6): 371-375. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-6-371-375

Gapon M.N.¹, Telesmanitch N.R.², Ternovskaya L.N.¹, Chaika S.O.², Chaika I.A.², Mikashinovich Z.I.², Tverdokhlebova T.I.¹

THE TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETER INTRA-SPECIFIC DIAGNOSTIC OF STRAINS OF ESCHERICHIA ISOLATED FROM PATIENT

¹The Rostovskii research institute of microbiology and parasitology of Rospotrebnadzor, 344000 Rostov-on-Don, Russia; ²The Rostovskii state medical university of Minzdrav of Russia, 344022 Rostov-on-Don, Russia

The time-of-flight mass spectrometer analysis of freshly separated human colibacillus populations for identification of markers of proteom specific for hemolytic and non-hemolytic strains, Escherichia-associant of opportunistic enterobacteria. The material consisted of 20 strains of mono-population of hemolytic Escherichia; 100 strains of mono-population of non-hemolytic Escherichia; 15 non-hemolytic strains isolated from association with opportunistic enterobacteria. The protein profiling was implemented on mass spectrometer MALDI-TOF MS Autoflex "Bruker Daltonik". The value within type of peak mass-charge with 100% intensity equal to 9000 Da can be used as a differentiating indication of detection of hemolytic Escherichia at mass-spectrometer biotyping. The proteom characteristics of strains of various populations within Escherichia coli species are given. The taxon-specific markers for proteom differentiation of population of Escherichia are given too.

Key words: Escherichia; mass-spectrometry; mass-peak listing; bio-typing

For citation: Gapon M.N., Telesmanitch N.R., Ternovskaya L.N., Chaika S.O., Chaika I.A., Mikashinovich Z.I., Tverdokhlebova T.I. The time-of-flight mass spectrometer intra-specific diagnostic of strains of Escherichia isolated from patient. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (6): 371-375. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-6-371-375

For correspondence: Gapon M.N., candidate of biological sciences, leading researcher of laboratory of sanitary microbiology of water bodies and human microbial ecology. e-mail: marina.gapon@mail.ru

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

Financing. The study had no sponsor support

Received 30.06.2015
Accepted 15.12.2015

Введение. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ, примененный для идентификации различных патогенов бактериального и грибкового происхождения на основе базы данных Вiotурег, включающей 5000 различных профилей микроорганизмов, это практически рутинный метод, широко представленный в мировой литературе [1—3].

E.coli является тем микроорганизмом, изучение которого лежало в основе идентификации эшерихий и исследования возможностей использования кишечной палочки в качестве бактериального стандарта калибровки для MALDI-TOF масс-спектрометрии [4].

Большинство современных статей посвящено препаративной идентификации отдельных белков клеток *E.coli*, предварительно выделенных путем двухмерного электрофореза. Между тем остро ощущается необходимость совершенствования дифференциальной диагностики эшерихий и раннего экспресс-выявления вирулентных представителей этого вида.

Выработка гемолизина — один из факторов патогенности многих микроорганизмов, она считается патогенетическим признаком. Установлено, что основной особенностью микрофлоры толстой кишки людей с дискинезией желчевыводящих путей (ДЖВП) является присутствие гемолитических форм эшерихий. ДЖВП относят к эндогенным факторам, которые обуславливают дисбактериозы и появление гемолитических (вирулентных) вариантов эшерихий. Вместе с тем большинство лечащих врачей в качестве средств, элиминирующих гемолитические эшерихии, выбирают антибактериальные препараты, что ведет к дестабилизации клеточных мембран эпителиоцитов и к хронизации дисбиотических состояний [5].

В работе [6] подчеркнута, что «в основе бактериально-гастальных отношений лежит полиморфизм клонов кишечной палочки». При этом выделено четыре кластера эшерихий (мутуалисты, комменсалы, паразиты, случайные симбионты человека), показана необходимость поиска различных маркеров, способных обеспечить дифференциальную диагностику данных групп. Поиск маркеров протеома между различными

кластерами эшерихий, в частности между гемолитическими и негемолитическими вариантами, является актуальной проблемой, решение которой расширит перспективы в плане дифференциальной диагностики и анализа происхождения факторов патогенности эшерихий, что позволит совершенствовать подходы к коррекции дисбиотических состояний.

Цель работы — поиск дифференциальных маркеров первичных транскриптов рибосомальных белков протеома свежесыведенных от человека штаммов эшерихий на основе создания коллекции протеомных профилей масс-спектров.

Материалы и методы. Популяции кишечной палочки выделяли и идентифицировали бактериологическим методом в соответствии с ОСТ 2003 г. от людей, проходивших обследование на дисбактериоз толстой кишки в ФБУН Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии.

Ультразвуковое исследование (УЗИ) с целью выявления дисфункциональных нарушений желчного пузыря (ДЖВП) осуществляли в медицинском центре ООО «Альянс — 2000».

Для масс-спектрометрического анализа было взято 135 свежесыведенных штаммов кишечной палочки: 20 штаммов гемолитических эшерихий (монопопуляция), выделенных от одного человека с ДЖВП; 100 штаммов негемолитических эшерихий (монопопуляция) от одного человека, 15 штаммов негемолитических вариантов, выделенных из ассоциации с условно патогенными энтеробактериями родов *Klebsiella* и *Enterobacter* от одного человека.

Протеомный анализ клеток спектров микроорганизмов проводили с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF MS Autoflex Bruker Daltonik (Германия).

Пробоподготовку осуществляли с применением в качестве матрицы α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (HCCA, Bruker Daltonik), все образцы штаммов проводили через процедуру экстракции трифторуксусной кислотой (80% ТФУ) для создания репрезентативных спектров. Супернатант штаммов в количестве 0,5 мкл помещали на ячейки MSP-чипа и после полного высушивания насулаивали 0,5 мкл раствора матрицы. В программе Flex control проводили «обстрел» лазером в ручном режиме.

В качестве стандарта калибровки использовали коммерческий препарат DH₅-alpha *Escherichia coli* (Bruker bacteria test standart).

В качестве контроля спектров молекулярных масс белков бактериальных клеток использовали масс-пик-листы (MSP-peak-list) и графики масс-спектров референтных штаммов: *E.coli* ATCC 25922 CHB; *E.coli* ATCC 35218 CHB; *E.coli* ATCC 25922 TH4; *E.coli* B 421 UF4; *E.coli* DH₅-alpha BR4; *E.coli* DSMS 300 83 THAM; *E.coli* ESB4-EA-RSS-1528TCHB; базы данных Biotyper.

Для визуализации, компьютерной обработки и анализа полученных спектров, в частности масс-пик-листов штаммов, использовали программу Flex analysis. Измерения осуществлялись в автоматическом режиме с контролем мерцания, частотой измерения лазера от 50 до 60 Гц, излучения лазера 1:25 кВ, с использованием источника ионов № 1 со значением 19,52 кВ и источника № 2 со значением 18,26 кВ и коэффициентом усиления детектора 27272 В.

Результаты. В процессе сравнительного анализа спектров константных рибосомальных белков представителей разных популяций *E.coli* сравнивали такие параметры, как положение пиков, их частота, интенсивность.

Графическое изображение спектра, состоящее из пиков разной интенсивности (коротких и длинных), является отображением масс-пик-листа, который представляет собой таблицу с числовыми значениями основного белкового спектра каждого штамма; в первом столбце таблицы — молекулярная масса белков (их масс-заряд, m/z), во втором — количество белков с конкретной молекулярной массой, выражающееся в интенсивности пика (в %), на графике — в высоте пика [3, 7, 8].

Нами выявлены общие, характерные для всех популяций вида *E.coli* закономерности строения протеома:

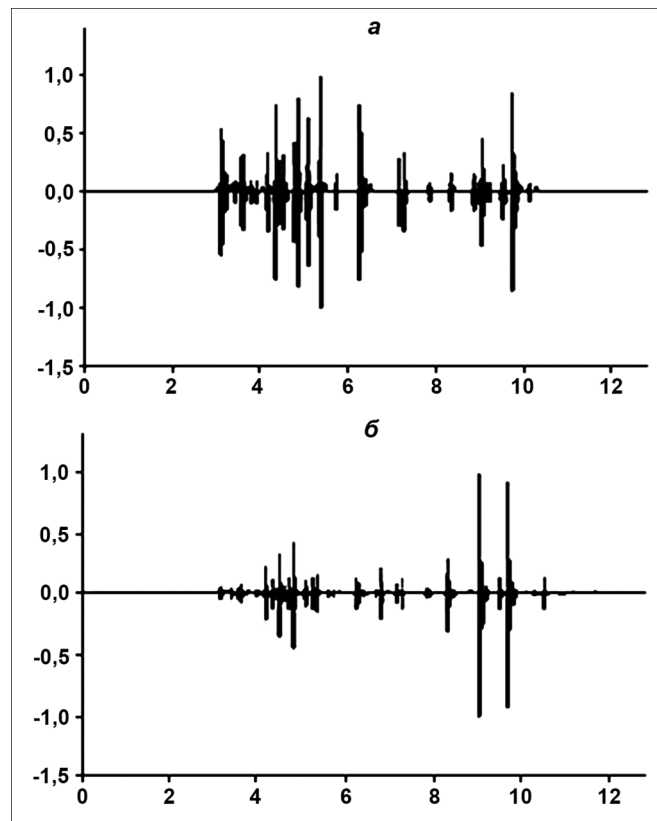
- наличие у всех штаммов 70 пиков;
- наличие одного самого высокого пика со 100% интенсивностью;
- минимальное количество высокомолекулярных пиков, имеющих $m/z \geq 10000$ Da;
- низкомолекулярные белки представлены спектром от 3000 до 4000 Da, практически равное количество пиков с m/z 3000—4000 Da у всех штаммов низкой интенсивности.
- отсутствие у всех штаммов пептидов с m/z до 2500 Da, что также соотносится с характеристикой референсных профилей *E.coli* из базы данных Biotyper.

В качестве маркеров, дифференцирующих монопопуляции, можно отметить следующие признаки. Популяции гемолитических эшерихий отличались тем, что у всех без исключения штаммов самый высокий пик со 100% интенсивностью имел массу или m/z , равный 9063—9066 Da. У негемолитических штаммов пик со 100% интенсивностью имел m/z в диапазоне 5381—5410 Da, и только у 10% штаммов этой группы m/z составлял 9713—9745 Da.

Популяция негемолитических эшерихий — ассоциантов отличалась гетерогенностью по данному признаку. Так, у 25% штаммов популяции 100% пик имел m/z 5382—5383 Da (как у негемолитических), у 42% — m/z 100% пика составлял 9740—9743 Da (как у гемолитических вариантов), и только 6% имели 100% пик с m/z 6258 Da, который не имели другие группы штаммов.

Среди других межпопуляционных различий для негемолитической монопопуляции можно выделить наличие двух высокомолекулярных пиков низкой интенсивности (до 10%) — m/z 10 140 и 10 280 Da, что также соотносится с референсными штаммами, имеющими аналогичные пики. Однако у некоторых свежевыделенных гемолитических штаммов появляются белки с m/z 14 000 Da, чего нет у референсных вариантов и штаммов негемолитической популяции.

Можно отметить, что масс-спектры негемолитической по-



Сравнение масс-спектрометрического протеомного профиля основных спектров негемолитического и гемолитического штаммов *E.coli*.

a — основной масс-спектр негемолитического штамма *E. Coli*; *б* — основной масс-спектр гемолитического штамма *E. Coli*. По оси абсцисс — значение масс-заряда (m/z); по оси ординат — интенсивность пика, %.

пуляции в целом интенсивнее (интенсивность 40—90%), что выражается преимущественным наличием высоких пиков (см. рисунок), для негемолитических штаммов характерно большее количество низкомолекулярных белков (пептидов) с m/z 3000—4000 Da, характеризующихся высокой интенсивностью.

Весь спектр для гемолитических штаммов отмечен преимущественно наличием «коротких» пиков низкой интенсивности (до 30%) и практически только двух пиков высокой интенсивности (70—100%).

Для гемолитических штаммов характерно наличие одного высокомолекулярного пика — m/z 10 500 Da низкой интенсивности, составляющей 15%.

Обсуждение. Времяпролетная масс-спектрометрия MALDI-TOF — это физический метод измерения массы ионов исследуемых веществ и получение спектров молекулярных масс исследуемых образцов. Выявление специфичных для конкретного вида микроорганизма спектров константных рибосомальных белков клетки (транскриптов) за счет осуществления прямого белкового профилирования дает возможность констатировать и анализировать уникальные для изучаемого объекта, рода, вида, группы биомаркеры, являющиеся, по существу, «отпечатками пальцев» конкретного представителя нозологии [9].

Программное обеспечение MALDI-TOF масс-спектрометра (Bruker, Biotyper 3.0) дает возможность получать персональные виртуальные коллекции спектров интересующих популяций, а программа Flexanalysis — анализировать

сходства и различия штаммов, а также появляющиеся и исчезающие протеомные признаки, в итоге мы имеем возможность получать новые данные об изменчивости протеома и транскриптома штаммов в зависимости от условий обитания, включая экосистему. Информация выдается в графическом и цифровом вариантах.

Масс-пик-лист (MSP-list) — это таблица с числовыми значениями графического спектра белкового профиля микроорганизмов, в первом столбце расположена информация о молекулярной массе белков или их масс-заряд (m/z), а во втором — количество данных белков с конкретной молекулярной массой, выражающееся в интенсивности пика (в %), а на графическом изображении — в высоте пика.

Большинство современных статей по масс-спектрометрии посвящено препаративной идентификации отдельных белков *E. coli*, предварительно выделенных посредством двухмерного электрофореза [10].

Изучение межпопуляционных различий путем анализа спектров коллекций кишечной палочки, выделенных от людей, в литературе не описано.

Ранее нами было установлено, что основной особенностью микрофлоры толстой кишки людей с ДЖВП является присутствие гемолитических форм кишечной палочки [11].

Анализируя результаты собственных бактериологических исследований и результаты УЗИ, мы выявили, что при восстановлении функционирования желчевыделительной системы гемолитический признак эшерихий исчезает, это свидетельствует о возможной роли желчи и ряда других факторов в индуцибельности, вирулентности и гемолитичности штамма — возбудителя заболевания.

Полученные нами данные об изменении транскриптов эшерихий разных монопопуляций подтверждают версию об изменчивости негемолитических форм в условиях организма хозяина и индуцибельности гемолитического признака, а значит, о появлении вирулентных вариантов из невирулентных.

Так, выявленный нами одиночный пик самой высокой интенсивности — 100% — может служить дифференциальным протеомным таксономическим признаком, по которому без постановки чашечного метода можно определить наличие у штаммов *E. coli* гемолитических свойств. Диагностическая ценность пика со 100% интенсивностью состоит в том, что у гемолитических эшерихий он имеет m/z 9063—9066 Да, у негемолитических — m/z самого высокого пика составляет 5381—4100 Да.

Популяция ассоциантов гетерогенна по данному признаку, хотя и относится к негемолитической группе. Молекулярные массы 100% пика представлены m/z 9000, 5000, 6000 Да. Референсные спектры *E. coli* базы данных Bioturer представляют 100% пик m/z 5000 Да, что характерно для негемолитической популяции.

Заключение. На основе полученной расширенной виртуальной коллекции масс-спектров нам удалось охарактеризовать первичные транскрипты рибосомальных белков протеома разных представителей вида эшерихий негемолитической монопопуляции, гемолитической монопопуляции, монопопуляции — эшерихий ассоциантов; сравнить протеомы спектров с протеомным профилем группы референсных представителей вида *E. coli*, имеющихся в базе данных Bioturer; найти сходство и различия; конкретизировать данные масс-спектрометрической идентификации, приводящей к дифференциации внутри вида гемолитических от негемолитических вариантов по 100% пику, что не позволяет сделать программа автоматической идентификации на основе коммерческой базы данных референсных штаммов.

Наблюдаемое при ДЖВП нарушение поступления желчи в просвет кишечника, возможно, является одним из факторов, способствующих вегетированию гемолитических эше-

рихий в микробиоценозах толстой кишки. Однако данный вид патологии — далеко не единственная причина появления в составе микрофлоры кишечника гемолитических эшерихий, возможно, что на их формирование оказывают влияние и другие изменения в желчеобразующих и желчевыделительных органах, что требует дальнейшего изучения. Очевидно, что появление гемолитических эшерихий в составе микрофлоры можно рассматривать как индикатор, реагирующий на изменения гомеостаза хозяина. С этих позиций совершенствование дифференциальной диагностики гемолитических эшерихий масс-спектрометрическим методом с помощью выявленных таксономических протеомных маркеров будет полезным для экспресс-выявления группы риска среди условно здоровых людей, для профилактики формирования заболеваний гепатобиллиарной и пищеварительной систем.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 4, 10 см. REFERENCES)

2. Кубанова А.А., Говорун В.М., Ильина Е.Н., Верещагин В.А., Фриго Н.В., Припутневич Т.В. Первый опыт применения метода прямого профилирования для идентификации и типирования *N. gonorrhoeae*. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2006; (5): 25—9.
3. Телесманич Н.Р., Агафонова В.В., Чемисова О.С., Чайка И.А., Водопьянов О.С., Водопьянов А.С. и др. Протеомный масс-спектрометрический анализ и типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на территории Российской Федерации в 2010—2012 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; (2): 97—9.
5. Гапон М.Н. Показатели местной неспецифической резистентности при дисбактериозе толстой кишки. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010; (5): 53—7.
6. Гриценко В.А., Бухарин О.В. Экологические и медицинские аспекты симбиоза *Escherichia coli* и человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000; (3): 93—9.
7. Телесманич Н.Р., Агафонова В.В., Чайка И.А., Сеина С.О., Чемисова О.С., Гончаренко Е.В. и др. MALDI масс-спектрометрический анализ в типировании и внутривидовой дифференциации холерных вибрионов на основе создания референс — библиотеки протеомных профилей. *Медицинский вестник Юга России*. 2014; (2): 88—91.
8. Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Водяницкая С.Ю., Чемисова О.С., Чайка И.А. Применение масс-спектрометрического метода MALDI-TOF для межвидовой дифференциации близкородственных видов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (8): 27—8.
9. Водяницкая С.Ю., Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Чайка И.А., Иванова Н.Г. MALDI-TOF протеомный анализ в исследовании судовых балластных вод в портах Ростовской области. *Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие*. 2014; 9 (4): 82—9.
11. Терновская Л.Н., Гапон М.Н., Хиштова Н.С., Соловьева Е.И., Балицкая Л.Л. Особенности микробиоценоза толстой кишки людей с дисфункциональными расстройствами билиарного тракта. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2009; (3): 89—92.

Поступила 30.06.15

REFERENCES

1. Williamson Y.M., Moura H., Woolfitt A.R., Pirkle J.L., Barr J.R., Carvalho Mda G. et al. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* conjunctivitis outbreak isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74 (19): 5891—7.
2. Kubanova A.A., Govorun V.M., Il'ina E.N., Vereshchagin V.A., Frigo N.V., Pripunovich T.V. The first experience with the use of the

- direct protein profiling method to identify and type *N. gonorrhoeae*. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2006; (5): 25—9. (in Russian)
- Telesmanich N.R., Agafonova V.V., Chemisova O.S., Chayka I.A., Vodop'yanov O.S., Vodop'yanov A.S. et al. Proteomic mass spectrometry analysis and typing of strains of *Vibrio cholerae*, allocated on the territory of the Russian Federation in 2010—2012. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2014; (2): 97—9. (in Russian)
 - Pribil P., Fenselau C. Characterization of Enterobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2005; 77 (18): 6092—5.
 - Gapon M.N. The local indicators of nonspecific resistance with dysbiosis of the colon. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2010; (5): 53—7. (in Russian)
 - Gritsenko V.A., Bukharin O.V. Ecological and medical aspects of symbiosis of *Escherichia coli* and person. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2000; (3): 93—9. (in Russian)
 - Telesmanich N.R., Agafonova V.V., Chayka I.A., Seina S.O., Chemisova O.S., Goncharenko E.V. et al. MALDI mass-spectrometric analysis for typing and intraspecies differentiation of cholera vibrios on the base of construction of the reference library of proteomic profiles. *Meditinskiy vestnik Yuga Rossii*. 2014; (2): 88—91. (in Russian)
 - Telesmanich N.R., Chayka S.O., Vodyanitskaya S.Yu., Chemisova O.S., Chayka I.A. The application of mass spectrometry technique MALDI-TOF for inter-specific differentiation of closely related species. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59 (8): 27—8. (in Russian)
 - Vodyanitskaya S.Yu., Telesmanich N.R., Chayka S.O., Chayka I.A., Ivanova N.G. MALDI-TOF proteomic analysis in the study of shipping ballast waters in sea ports of Rostov regions. *Zhizn' bez opasnostey. Zdorov'e. Profilaktika. Dolgoletie*. 2014; 9 (4): 82—9. (in Russian)
 - Rodina E., Vorobieva N., Kurilova S., Mikulovich J., Vainonen J., Aro E.M. et al. Identification of new protein complexes of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase using pull-down assay. *Biochimie*. 2011; 93 (9): 1576—83.
 - Ternovskaya L.N., Gapon M.N., Khishtova N.S., Solov'eva E.I., Balitskaya L.L. The peculiarities of the large intestines microbiocenosis in people with the dysfunctional disorders of the biliary canal. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2009; (3): 89—92. (in Russian)

Received 30.06.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 579.843.1.082.1:543.42.062

Телесманич Н.Р.¹, Чайка С.О.^{1,2}, Чайка И.А.^{1,2}, Гончаренко Е.В.², Ломов Ю.М.¹

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ MALDI-TOF В ИДЕНТИФИКАЦИИ И ТИПИРОВАНИИ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

¹ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ, кафедра общей и клинической биохимии № 1, Ростов-на-Дону, 344022, Российская Федерация; ²ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

На основе созданной нами базы данных «Белковые профили масс-спектров представителей вида *Vibrio cholerae* для программы MALDI Biotyper» проведено типирование штаммов холерных вибрионов, выделенных на территории Российской Федерации в 2010—2012 гг., а также проведен анализ степени сходств и отличий константных рибосомальных белков. По результатам MALDI-TOF масс-спектрометрии изучаемые штаммы *V. cholerae* были разделены на 2 четких кластера. В один кластер вошли все эпидемически опасные штаммы, выделенные от людей, приехавших в Москву из Индии в 2010—2012 гг., во второй — атоксигенные вибрионы, не относящиеся к серогруппам O1 / O139, выделенные в 2011 г. у жителей г. Таганрога. Анализ основных спектров всей коллекции позволил нам идентифицировать таксон — специфические компоненты, отличающие штаммы *V. cholerae* не O1 / не O139 от штаммов *V. cholerae* El Tor. Таким образом, созданная нами база данных протеомных портретов *V. cholerae* позволяет проводить идентификацию, изучение и типирование возбудителей холеры и других представителей вида *V. cholerae*, определяя их филогенетическое родство, что чрезвычайно полезно для установления происхождения штаммов, выделенных из объектов окружающей среды, и эпидемиологической расшифровки вспышек заболевания.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*; MALDI-TOF масс-спектрометрия; протеомный анализ.

Для цитирования: Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Чайка И.А., Гончаренко Е.В., Ломов Ю.М. Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF в идентификации и типировании штаммов холерных вибрионов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (6): 375-379. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-6-375-379

Telesmanich N.R.¹, Chaika S.O.^{1,2}, Chaika I.A.^{1,2}, Goncharenko E.V.², Lomov Yu.M.¹

THE MASS-SPECTROMETRIC ANALYSIS OF MALDI-TOF IN IDENTIFICATION AND TYPING OF STRAINS OF COMMA BACILLUS

¹The Rostovskii state medical university of Minzdrav of Russia, 344022 Rostov-on-Don, Russia; ²The Rostovskii anti-plague institute of Rospotrebnadzor, 344002 Rostov-on-Don, Russia

The data base “Protein profiles of mass-specters of representatives of species of *Vibrio cholerae* for program MALDI Biotyper” was used to implement typing of strains of comma bacillus isolated at the territory of the Russian Federation in 2010-2012. Also, analysis of degree of similarity and differences among constant ribosomal proteins was implemented. According the results of MALDI-TOF mass-spectrometry strains of *V.cholerae* were grouped in two distinct clusters. The first cluster included all epidemically dangerous strains isolated from people arrived in Moscow from India 2010-2012. The second cluster included atoxigenic vibrio with no relation to serogroups O1/O139 isolated from residents of Taganrog in 2011. The analysis of main