

Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Балахонов С.В.

MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ, ХОЛЕРЫ И ТУЛЯРЕМИИ

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора, 664047, г. Иркутск

В представленном обзоре рассматриваются общие вопросы методологии новой технологии в лабораторной диагностике инфекций – MALDI-ToF MS-анализа (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; матрично-активированная лазерная десорбционно-ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия), а также ряд частных вопросов, касающихся использования данной технологии в идентификации и типировании возбудителей особо опасных инфекций – чумы, холеры и туляремии. Обсуждается проблема пробоподготовки образцов к исследованию и обеспечение биологической безопасности.

Ключевые слова: MALDI-ToF MS-анализ; MALDI-ToF MS-идентификация; *Yersinia pestis*; *Vibrio cholera*; *Francisella tularensis*.

Общие сведения о MALDI-ToF масс-спектрометрии

Одним из наиболее активно развивающихся в последние годы направлений в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний является технология MALDI-ToF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетным разделением) [1]. В основе метода MALDI-ToF лежит процедура мягкой ионизации исследуемого материала (аналита), позволяющая в присутствии особого вещества, так называемой матрицы, под воздействием лазера ионизировать биологические макромолекулы (пептиды, белки, ДНК, олигонуклеотиды, липополисахариды и сахара) без их фрагментации и деструкции. Матрица – вещество кислой природы, которое, будучи сокристаллизованным с анализом, при воздействии лазерного импульса обеспечивает передачу энергии лазера молекулам исследуемого объекта, ионизируя их и переводя в газовую фазу [2]. В качестве матриц используются вещества как сложной органической, так и неорганической природы [3, 4]. Наиболее широко применяется α -циано-4-гидроксикоричная кислота (англ. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; CHCA), синяпиновая кислота (англ. sinapinic acid; SA), феруловая кислота (ferulic acid; FA) и дигидробензойная кислота (англ. 2,5-dihydroxybenzoic acid; DHB) [5, 6].

После десорбции преимущественно однозарядные ионизированные молекулы ускоряются в электрическом поле, попадают в разделительную часть прибора (представляющую собой трубу, в полости которой поддерживается вакуум), по прохождении которой ионы достигают детектора. Скорость движения и, соответственно, время прохождения расстояния от точки ионизации до детектора, обратно пропорционально массе ионов. Зная длину пути перемещения иона от ионизатора до детектора, а также время этого перемещения, можно вычислить скорость движения иона и, на основании ее значения, рассчитать массу частиц, присутствующих в анализе, а также генерировать спектр, характеризующий качественный состав исследуемого объекта.

Одной из основных областей применения MALDI-ToF MS-анализа в биологии и медицине традиционно считалась клиническая и биологическая химия, в которой данный метод использовался для качественной и количественной детекции биомолекул различной природы в клиническом материале: сыворотке крови, моче, слюне, цереброспинальной жидкости, слезах, фрагментах тканей [7].

Для исследования микроорганизмов MALDI-ToF MS впервые был применен достаточно давно, в середине 70-х годов прошлого века [8], однако активное внедрение этого метода в практику лабораторной диагностики началось в последнее десятилетие. Во многом это было связано с совершенствованием приборной базы, накоплением фактического материала о возможностях технологии масс-спектрометрического анализа для идентификации и углубленной характеристики микроорганизмов.

Идентификация микроорганизмов с использованием MALDI-ToF MS осуществляется путем сравнения белкового спектра исследуемого штамма с базовой коллекцией спектров референсных микроорганизмов известных видов. На основании степени соответствия спектров определяется принадлежность исследуемого микроорганизма к определенному виду (роду) [9]. Кроме того, существует алгоритм идентификации, при котором значения масс ионов в полученном спектре неизвестного микроорганизма сравниваются с массами белков, аннотированных в протеомных базах данных и/или предсказанных на основании нуклеотидных последовательностей геномов [10, 11].

В процессе экспериментальных исследований установлено, что большая часть пиков спектра, особенно в диапазоне от 4 до 15 кД, соответствует белкам. Среди них преобладают интактные или прошедшие посттрансляционную модификацию рибосомальные белки – до половины пиков, представленных в спектре. Так же достаточно стабильно в спектре детектируются белки холерного шока и ДНК-связывающие белки [12–14].

Процедура выполнения MALDI-ToF MS-анализа достаточно проста и не требует большого количества времени и специальных навыков персонала. Для исследования необходима чистая культура микроорганизма (единичная изолированная колония), забранная в экспоненциальной фазе роста. Далее возможно нанесение на специальную металлическую подложку – мишень либо чистой культуры без дополнительной обработки, либо экстракта, полученного после предварительной обработки суспензии исследуемой культуры физическими или химическими методами [15–17]. В последние годы разрабатывается ряд подходов, позволяющих проводить прямую идентификацию возбудителя в некоторых видах клинического материала, таких как моча, цереброспинальная жидкость, кровь [18–20].

В отношении приборной базы следует сказать, что на сегодняшний день для идентификации микроорганизмов существуют 3 коммерческих MALDI-ToF MS платформы: Andromas («Andromas SAS», Париж, Франция), Vitek-MS («bioMérieux», Франция), BioType («Bruker Daltonics», Германия), для каждой из которых создана собственная идентификационная база, разработан алгоритм идентификации и пробоподготовки [6, 21].

Многочисленные работы демонстрируют эффективность метода MALDI-ToF MS-идентификации для определения таксономической принадлежности микроорганизмов разных видов и групп [6, 22].

К недостаткам и ограничениям методики MALDI-ToF MS-идентификации можно отнести высокую стоимость оборудования, невозможность проведения идентификации и межвидовой дифференциации некоторых групп микроорганизмов, связанной со схожестью их масс-спектрометрических профилей, низким качеством спектров из-за устойчивости отдельных объектов к компонентам стандартных протоколов пробоподготовки, отсутствием референсных спектров, доступных в базе данных, недостаточной разрешающей способностью метода, а также с необходимостью работы с чистыми культурами или изолированными колониями [22].

Учитывая высокую производительность, скорость анализа, простоту и низкую стоимость пробоподготовки, методика MALDI-ToF MS-идентификации хорошо вписывается в алгоритм функционирования микробиологических лабораторий, особенно при необходимости масштабных скрининговых исследований первичных посевов [1]. Универсальность платформы MALDI-ToF MS позволяет не только идентифицировать микроорганизм, но и определять его свойства, например, такие, как устойчивость к антибактериальным препаратам [23] и генетический профиль [24].

Безусловно, вышеуказанные особенности и преимущества масс-спектрометрической идентификации определяют актуальность применения ее в лабораторной диагностике особо опасных и природно-очаговых инфекций, поскольку от скорости и точности видовой идентификации зависит принятие решения о необходимости и объемах экстренных противоэпидемических и профилактических мероприятий.

В данном обзоре на основании данных литературы и собственных экспериментальных исследований рассматриваются особенности применения технологии MALDI-ToF MS в идентификации возбудителей особо опасных бактериальных инфекций на примере чумы, холеры и туляремии.

Масс-спектрометрический анализ возбудителя чумы и других микроорганизмов рода *Yersinia*

Первоначально для изучения представителей рода *Yersinia* MALDI-ToF MS применяли как традиционный метод физико-химического анализа биологических макромолекул. С использованием этой технологии проводили исследования особенностей химической структуры и модификаций липополисахарида возбудителей чумы – *Y. pestis* [25] и кишечного иерсиниоза – *Y. enterocolitica* [26], белков возбудителя псевдотуберкулеза – *Y. pseudotuberculosis* [27].

Для межвидовой идентификации представителей рода *Yersinia* MALDI-ToF масс-спектрометрию стали применять относительно недавно. В одной из первых работ, рассматривающих возможность применения масс-спектрометрического анализа для определения таксономического положения представителей *Yersinia spp.*, была изучена коллекция, состоящая из 146 штам-

мов *Yersinia spp.*, включающая все известные на тот момент виды иерсиний (13 видов), а также 35 штаммов представителей семейства *Enterobacteriaceae* других видов [28]. Авторами была создана база видоспецифических спектров и проведен их сравнительный анализ. На основании полученных данных выделены группы биологических маркеров (спектральных пиков с определенным значением m/z), соответствующих семейству *Enterobacteriaceae* (значения m/z 4185 и 8370), роду *Yersinia* (значения m/z 4350, 5427, 6046 и 6241) и определенным видам: *Y. enterocolitica* (значения m/z 7149, 7262, 7318, 9238, 9608 и 9651), *Y. pseudotuberculosis/Y. pestis* (m/z 6637, 7274, 7783, 9268 и 9659), *Y. pseudotuberculosis* (m/z 6474), *Y. pestis* (m/z 3065). С использованием протеомных баз данных удалось идентифицировать ряд биомаркеров, соотнеся значения m/z с конкретным клеточным белком/пептидом. Дополнительный протеомный анализ белковых экстрактов *Y. pestis* с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной MALDI-ToF масс-спектрометрии позволил установить, что специфичный для *Y. pestis* спектральный пик с m/z , равным 3065, соответствует пептиду, состоящему из 30 аминокислотных остатков, образуемому в процессе посттрансляционной модификации молекулы активатора плазминогена – Pla в результате отщепления N-концевого фрагмента.

Кластерный анализ на основе спектральных характеристик исследуемых штаммов дал возможность уточнить таксономическое положение *Y. ruckerii* как обособленного вида относительно других представителей рода *Yersinia*. Стоит отметить, что на основании масс-спектрометрических профилей не удалось дифференцировать *Y. similis*, который оказался в одном кластере с *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*.

В целом по результатам работы авторами сделан вывод о том, что использование метода MALDI-ToF позволяет, особенно в сочетании с дополнительными методами биоинформационного анализа, достаточно эффективно идентифицировать представителей рода *Yersinia*, в том числе имеющих клиническое значение.

Эффективное видовое определение с помощью масс-спектрометрического анализа возбудителя чумы и его дифференциация от близкородственного вида, *Y. pseudotuberculosis*, а также корректная таксономическая идентификация непатогенных видов иерсиний продемонстрирована в работе S. Ayyadurai и соавт. [29]. Помимо определения микроорганизмов на видовом уровне авторам, на основании статистического анализа распределения частот встречаемости маркерных пиков удалось провести внутривидовую кластеризацию *Y. pestis*, отнести штаммы по принадлежности к трем основным био-варам: *Antiqua*, *Medievalis* и *Orientalis*.

Дифференциация возбудителей чумы и псевдотуберкулеза методом MALDI-ToF MS представляет особый интерес и проблему для исследователей, поскольку как в вышеупомянутых работах [28, 29], так и в последующих наблюдениях, в том числе и на масс-спектрометрических платформах, использующих иные принципы анализа данных [30], отмечались противоречивые результаты, когда отличить один вид от другого удавалось лишь при применении дополнительных алгоритмов обработки и анализа спектров.

Помимо идентификации MALDI-ToF MS может использоваться для определения степени схожести исследуемых штаммов чумного микроба с целью установления источников и вероятных путей распространения инфекции. Продемонстрирована потенциальная возможность такого анализа, когда масс-спектрометрическим

методом, в совокупности с классическими микробиологическими и молекулярно-генетическими подходами, удалось установить потенциальный источник проникновения высоковирулентного, имеющего большое эпидемическое значение, штамма *Y. pestis* на территории, где ранее подобные варианты возбудителя не регистрировались [31].

В целом, исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о большой эффективности и перспективах применения анализа MALDI-ToF MS в идентификации и углубленной характеристике возбудителя чумы и иерсиний других видов, в первую очередь, энтеропатогенных. Однако не до конца разрешенным остается вопрос дифференциации близкородственных видов возбудителей чумы и псевдотуберкулеза, особенно с учетом подвидовой классификации *Y. pestis*. Очевидно, что на данном этапе работы требуется накопление фактического материала и тестирование альтернативных алгоритмов сравнительного анализа.

Масс-спектрометрический анализ возбудителя холеры и других микроорганизмов рода *Vibrio*

Различные векторы приложения MALDI-ToF MS нашли свое отражение и при изучении возбудителя холеры. С использованием данного подхода проводятся фундаментально ориентированные исследования *V. cholerae*: построение протеомной карты вибриона, определение дифференцированных уровней экспрессии и различных изоформ белковых продуктов, анализ экзопротеинов штаммов холерного вибриона разной эпидемической значимости, концевых эпитопов O1-антигена и другие [32–34].

Первые исследования по быстрой идентификации, характеристике микроорганизмов рода *Vibrio* и дифференциации их с близкородственными таксономическими группами на основании определения белкового профиля микробной клетки были проведены в 2009–2010 гг. [35, 36]. R. Dieckmann и соавт. [36] осуществляли MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ репрезентативной выборки из 83 штаммов, включая штаммы 17 видов рода *Vibrio*, 7 видов *Aeromonas*, а также штаммы *Grimontia hollisae* и *Photobacterium damselaе*. В процессе анализа удалось осуществить дифференциацию близкородственных видов рода *Vibrio*, таких как *V. parahaemolyticus* – *V. alginolyticus* и *V. cholerae* – *V. mimicus*, что позволило авторам сделать заключение о высокой эффективности данного метода. Вместе с тем идентифицированные по биохимическим тестам как *V. fluvialis* и *V. furnissii* виды оказались неразличимы масс-спектрометрически, что согласовывалось с данными одного из референсных методов генетической идентификации микроорганизмов – секвенирования гена *rpoB*. Для углубленной дифференциации на родовом, видовом и внутривидовом уровнях авторы осуществляли определение видо-идентифицирующих биомаркерных ионов (species-identifying biomarker ions-SIBIs).

Высокая диагностическая ценность MALDI-ToF масс-спектрометрического профилирования для быстрой и точной идентификации и дифференциации микроорганизмов рода *Vibrio* подтверждена при исследовании изолированных из сточных вод в Марокко штаммов *V. cholerae* не O1/O139, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii* [37]. Анализ спектральных паттернов показал, что типичные для рода *Vibrio* спектры содержат около 150 пиков в диапазоне 2–20 кД с наибольшей интенсивностью их в области масс 2–11 кД. При этом спектры, наряду с существенным межвидовым сходством, характеризуются наличием видоспецифических

биомаркерных пиков (m/z 2400, 2800, 3800) и при кластерном анализе наблюдается дифференциация на отдельные группы штаммов в зависимости от их видовой принадлежности.

Масс-спектрометрический анализ применяли для ускоренной идентификации микроорганизмов в балластных водах морских судов [38]. Среди изолированных из проб воды микроорганизмов 8 штаммов по профилю белковых спектров идентифицированы как принадлежащие к роду *Vibrio*. При этом сходство как на белковом, так и нуклеотидном (определение структуры генов 16S rRNA) уровнях определено лишь для 50% этих изолятов, тогда как остальные демонстрировали расхождение результатов двух тестов. Ранее подобные результаты наблюдались при исследовании возможности идентификации микроорганизмов рода *Vibrio* с применением комплекса методов (MALDI-ToF масс-спектрометрия, секвенирование генов *16S rRNA* и *rpoB*). Оказалось, что при высокой сопоставимости результатов идентификации на основании белковых спектров и структуры гена *rpoB*, анализ последовательности генов *16S rRNA* не давал возможности дифференцировать изоляты *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* [39].

Тем не менее достоверное отличие спектральных паттернов *V. parahaemolyticus* от спектров других близкородственных микроорганизмов рода *Vibrio* установлено и при MALDI-ToF масс-спектрометрическом исследовании коллекции штаммов *V. parahaemolyticus*, изолированных от больных и из объектов окружающей среды на разных территориях США, а также референсных штаммов [35]. С использованием инструментов TagIdent авторы идентифицировали 30 биомаркерных пиков, присутствующих только в масс-спектрах *V. parahaemolyticus*. При этом интересен факт внутривидовой вариативности белкового профиля *V. parahaemolyticus*, выделенных в различных географических точках, в разное время и характеризующихся разным эпидемическим потенциалом, а также в индуцированных мутантах с делецией участвующих в системе «quorum sensing» генов, что определяет пригодность MALDI-ToF масс-спектрометрии не только для надежной и достоверной идентификации штаммов, но и как инструмент при мониторинге появления новых клонов патогена и установлении родства отдельных изолятов.

S.M. Malainine и соавт. [40] идентифицировали более 20 вариативных пиков в структуре спектральных паттернов, полученных при MALDI-ToF масс-спектрометрическом анализе 22 штаммов *V. parahaemolyticus*. Вариативные биомаркерные пики характеризовались меньшей интенсивностью по сравнению с общими для всех штаммов пиками и локализовались преимущественно в области 6–11 кД.

Применение MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа для идентификации возбудителя холеры в России до последнего времени было ограничено отсутствием в поставляемых базах данных программного обеспечения MALDI Biotyper специфических для *V. cholerae* спектров. Проведенные исследования по созданию собственных референсных библиотек спектров *V. cholerae* с последующим импортированием их в MALDI Biotyper показали эффективность идентификации холерного вибриона с использованием расширенной базы, в том числе и на внутривидовом уровне [41–43].

Таким образом, метод MALDI-ToF масс-спектрометрии, обладая целым рядом преимуществ, нашел широкое применение не только в протеомном анализе для картирования белков, но и в клинической лабораторной диагностике и мониторинговых исследованиях для

идентификации холерного вибриона и других микроорганизмов рода *Vibrio* на основании определения профиля референсных белков микробной клетки. Возможность получения индивидуальных специфичных для каждого штамма белковых паттернов по типу «отпечатков пальцев» в ряде случаев определяет эффективность применения прямого белкового профилирования для внутривидового типирования, установления родства отдельных изолятов, эпидемиологического мониторинга.

Масс-спектрометрический анализ возбудителя туляремии

Исследований, посвященных идентификации представителей рода *Francisella*, и в частности возбудителя туляремии, *F. tularensis*, с применением MALDI-ToF MS-анализа крайне мало. Это может быть связано с особенностями культивирования возбудителя, требующего специальных питательных сред, длительной инкубации и, зачастую, невозможностью получения культуры путем прямого посева исследуемого материала, особенно при исследованиях объектов окружающей среды.

Тем не менее описан опыт успешного применения масс-спектрометрического анализа в комплексной характеристике липополисахарида (ЛПС), полученного из вакцинного штамма *F. tularensis* SLV. Изучение коровой структуры ЛПС – липида А, а также химической структуры жирных кислот и сахаров, входящих в состав ЛПС, позволило более полно охарактеризовать эту молекулу, продемонстрировав ее сложность и вариабельность [44].

Достаточно убедительно продемонстрирована возможность масс-спектрометрической идентификации возбудителя туляремии до видового и подвидового уровня [45, 46]. При сравнительном анализе спектров выделены маркерные пики для вида *F. philomiragia* со значением m/z 6153 Д и 7757 Д, для *F. tularensis* subsp. *tularensis* – 6730 Д, для *F. tularensis* subsp. *holarctica* – 7800 Д. Результаты масс-спектрометрической идентификации подтверждали методом определения нуклеотидной последовательности гена *23S rRNA*. Воспроизводимость данных установлена при использовании различных питательных сред, условий культивирования, после проведения биологических проб, а также на различных моделях масс-спектрометрического оборудования. Полученные результаты позволили сделать выводы об эффективности применения масс-спектрометрической идентификации в диагностике туляремии, особенно для быстрого определения подвидовой принадлежности возбудителя.

Вопросы биологической безопасности при масс-спектрометрическом исследовании микроорганизмов I–II групп патогенности

Важной проблемой при исследовании возбудителей I–II групп патогенности/опасности методом MALDI-ToF MS-анализа является процедура пробоподготовки. В соответствии с принятой в РФ классификацией возбудителей инфекционных болезней *Y. pestis* относится к патогенным биологическим агентам I, а токсигенные *V. cholerae* и *F. tularensis* – II группы патогенности, поэтому все манипуляции с ними должны предусматривать возможность деконтаминации рабочих поверхностей, инструментария и оборудования. Масс-спектрометр, будучи достаточно сложным аналитическим инструментом, исключает возможность регулярного проведения текущей и заключительной дезинфекции внутренних рабочих поверхностей. Очевидно, что необходимо использовать такие протоколы, которые обеспечивают

обеззараживание исследуемого образца перед внесением его в прибор. С другой стороны, методика пробоподготовки должна обеспечивать получение качественных, воспроизводимых спектров, содержащих достаточное количество пиков в исследуемом диапазоне масс (от 2 до 15–20 кД). Применительно к возбудителю чумы проводили сравнительный анализ нескольких методов выделения белков. Так, С. Couderc и соавт. [47] провели сравнение двух методов пробоподготовки возбудителя чумы к масс-спектрометрическому анализу – метода экстракции с использованием 80% трифторуксусной кислоты и метода обработки водной суспензии возбудителя 70% этанолом в течение 60 мин. По инактивирующей способности и воспроизводимости оба метода продемонстрировали одинаковую эффективность. Однако более качественные и информативные спектры получались при использовании спиртовой экстракции, что отражалось в количестве пиков, а также в отношении параметра сигнал/шум для мажорного пика со значением m/z 6049 и значении идентификационного индекса соответствия. К недостаткам спиртовой обработки можно отнести длительность пробоподготовки. М. Drevinek и соавт. [48] выполнили более широкое исследование, сравнили применимость и биологическую безопасность 4 различных методов пробоподготовки (экстракция трифторуксусной кислотой, спиртовая обработка с последующей экстракцией муравьиной кислотой и ацетонитрилом, экстракция с использованием хлороформа и экстракция с использованием ацетонитрила) для широкого спектра возбудителей I–II групп биологической опасности/патогенности: *B. anthracis*, *C. botulinum*, *B. melitensis*, *B. mallei*, *Y. pestis*, *V. cholerae* и *F. tularensis*. Лучшие результаты продемонстрировала методика спиртовой обработки с последующей экстракцией муравьиной кислотой и ацетонитрилом, при которой удалось достичь стерильности исследуемых образцов (за исключением споробразующих микроорганизмов), получить максимальный выход белков после экстракции, а также наиболее насыщенные спектры с наилучшим соотношением уровней сигнал/шум. Кроме того эта методика позволила сохранять образцы в течение 26 дней после экстракции без значительного снижения эффективности идентификации.

Следует отметить, что аналогичную методику экстракции используют производители идентификационной платформы BioTiger для генерации библиотек референсных спектров и рекомендуют в качестве основного метода пробоподготовки при работе с грамположительными и грамотрицательными неспорообразующими микроорганизмами [49].

Заключение

В целом рассмотренный в обзоре метод MALDI-ToF масс-спектрометрической идентификации демонстрирует хорошие результаты и представляет весьма эффективный и перспективный инструмент для лабораторной диагностики возбудителей особо опасных инфекций.

На наш взгляд, одним из наиболее перспективных в этом направлении является внедрение технологии MALDI-ToF MS-анализа в систему микробиологического мониторинга холеры, который традиционно связан с большими объемами исследуемого материала и необходимостью широкого спектра скрининговых исследований [41, 42].

Важным направлением для дальнейшей работы является создание и масс-спектрометрический анализ коллекций штаммов возбудителей инфекций I–II групп биологической опасности/патогенности, относящихся к

разным био-, серо-, геновариантам, выделенных на различных территориях и обладающих разными клинически и эпидемически значимыми свойствами. На основе этих данных станет возможным решение вопроса о перспективах масс-спектрометрической внутривидовой дифференциации исследуемых микроорганизмов [50].

Определенные усилия должны быть направлены на преодоление одного из серьезных ограничений, стоящих перед исследователями, эксплуатирующими масс-спектрометрическую платформу BioTyper («Bruker Daltonics», Германия) – отсутствия в поставляемой в Российскую Федерацию версии идентификационной базы данных референсных спектров микроорганизмов I–II групп биологической опасности/патогенности, в том числе возбудителей чумы, холеры, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы. Существующая возможность дополнения пользователем имеющейся базы референсных спектров ставит перед исследователями задачу по созданию коллекций референсных штаммов микроорганизмов I–II групп биологической опасности, с последующей генерацией референсных спектров, и по проведению межлабораторной оценки эффективности идентификации возбудителей особо опасных инфекций с использованием обновленных вариантов базы данных.

Сведения об авторах:

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ Роспотребнадзора, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78

Афанасьев Максим Владимирович (Afanas'ev Maxim Vladimirovich) – канд.биол.наук, вед.научн.сотр. отдела эпидемиологии; e-mail: afanasev_max@mail.ru

Миронова Лилия Валерьевна (Mironova Lilia Valerevna) – канд.мед.наук, вед.науч.сотр., зав.лаб.холеры; e-mail: mironovalv@yandex.ru

Балахонов Сергей Владимирович (Balakhonov Sergey Vladimirovich) – д-р мед.наук, проф., директор, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Fournier P.-E., Drancourt M., Colson P., Rolain J.-M., La Scola B., Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11: 574–85.
2. Knochenmuss R., Dubois F., Dale M.J., Zenobi R. The matrix suppression effect and ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997; 10: 871–7.
3. Tholey A., Heinze E. Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives. *Analyt. Bioanal. Chem.* 2006; 386(1): 24–37.
4. Albrethsen J. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2007; 53: 852–8.
5. Williams T.L., Andrzejewski D., Lay J.O., Musser S.M. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003; 14: 342–51.
6. Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26: 547–603.
7. Cho Y.T., Su H., Huang T.L., Chen H.C., Wu W.J., Wu P.C. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. *Clin. Chim. Acta.* 2013; 415: 266–75.
8. Anhalt J.P., Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analyt. Chem.* 1975; 47: 219–25.
9. Sauer S., Freiwald A., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostrzewa M. et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One.* 2008; 3(7): e2843.
10. Pineda F.J., Lin J.S., Fenselau C., Demirev P.A. Testing the significance of microorganism identification by mass spectrometry and proteome database search. *Anal. Chem.* 2000; 72: 3739–44.
11. Pineda F.J., Antoine M.D., Demirev P.A., Feldman A.B., Jackman J., Longenecker M. et al. Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Analyt. Chem.* 2003; 75(15): 3817–22.
12. Ryzhov V., Fenselau C. Characterization of the Protein Subset Desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Analyt. Chem.* 2001; 73(4): 746–50.
13. Holland R.D., Duffy C.R., Rafii F., Sutherland J.B., Heinze T.M., Holder C.L. et al. Identification of bacterial proteins observed in MALDI TOF mass spectra from whole cells. *Analyt. Chem.* 1999; 71(15): 3226–30.
14. Ilina E.N., Borovskaya A.D., Malakhova M.M., Vereshchagin V.A., Kubanova A.A., Kruglov A.N. et al. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. *J. Mol. Diagn.* 2009; 11(1): 75–86.
15. Liu H., Du Z., Wang J., Yang R. Universal sample preparation method for characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73: 1899–907.
16. Machen A., Kobayashi M., Connelly M.R., Wang Y.F. comparison of heat inactivation method and cell disruption protocols for identification of mycobacteria from solid culture media using MALDI-TOF VITEK mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* JCM.02612-13; published ahead of print 25 September 2013, doi:10.1128/JCM.02612-13
17. Marklein G., Josten M., Klanke U., Müller E., Horré R., Maier T. et al. Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47: 2912–7.
18. Wang X.H., Zhang G., Fan Y.Y., Yang X., Sui W.J., Lu X.X. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *J. Microbiol. Method.* 2013; 92(3): 231–5.
19. Nyvang H. G., Kvistholm J. A., Böcher S., Damkjaer B. M., Pedersen M., Engell C. M. et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scand. J. Infect. Dis.* 2012; 42(9): 716–8.
20. Nonnemann B., Tvede M., Bjarnsholt T. Identification of pathogenic microorganisms directly from positive blood vials by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 2013; 121(9): 871–7.
21. Carbone E., Grohs P., Jacquier H., Day N., Tenza S., Dewailly A. et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *J. Microbiol. Meth.* 2012; 89(2): 133–6.
22. Croxatto A., Prodhom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass-spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012; 36(2): 380–407.
23. Hrabák J., Chudáková E., Walková R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26: 103–1.
24. Афанасьев М.В., Каракашев С.В., Ильина Е.Н., Салем А.С.А.М., Сидоренко С.В., Говорун В.М. Молекулярно-генетическая характеристика метициллин-устойчивых штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных в стационарах г. Москвы. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2010; 25(2): 20–4.
25. Афанасьев М.В., Каракашев С.В., Ильина Е.Н., Салем А.С.А.М., Сидоренко С.В., Говорун В.М. Molecular Genetic Characterization of Methi-cillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Recovered from Moscow Clinics. *Mol. Gen. Microb. Virusol.* 2010; 25(2): 66–70.
26. Prior J.L., Hitchen P.G., Williamson D.E., Reason A.J., Morris H.R., Dell A. et al. Characterization of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. *Microb. Pathog.* 2001; 30(2): 49–57.
27. Oertel C., Lindner B., Skurnik M., Holst O. Isolation and structural characterization of an R-form lipopolysaccharide from *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268(3): 554–64.
28. Сидорин Е.В., Ким Н.Ю., Лейченко Е.В., Анастюк С.Д., Дмитренко П.С., Набережных Г.А. и др. Выделение и характеристика низкомолекулярного иммуноглобулинсвязывающего белка из *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биохимия.* 2006; 71(11): 1570–6.
29. Сидорин Е.В., Ким Н.Ю., Лейченко Е.В., Анастюк С.Д., Дмитренко П.С., Набережных Г.А., Соловьева Т.Ф. Isolation and characterization of a low-molecular-weight immunoglobulin-binding protein from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry. (Mosc).* 2006; 71(11): 1278–83.
30. Lasch P., Drevinek M., Nattermann H., Grunow R., Stämmler, Dieck-

- mann M.R. et al. Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. *Analyt. Chem.* 2010; 82: 8464–75.
29. 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.
 30. Wittwer M., Heim J., Schär M., Dewarrat G., Schürch N. Tapping the potential of intact cell mass spectrometry with a combined data analytical approach applied to *Yersinia* spp.: detection, differentiation and identification of *Y. pestis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 2011; 34: 12–9.
 31. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяк А.С., Витязева С.А., Корзун В.М. и др. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2013; 1: 60–5.
Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vityazeva S.A., Korzun V.M. et al. The first case of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* isolation in the territory of altai mountain natural plague focus. Communication 1. Microbiological characteristics, molecular-genetic and mass-spectrometric identification of the isolate. *Problemy OOI.* 2013; 1: 60–5.
 32. Coelho A., de Oliveira Santos E., Faria M.L., de Carvalho D.P., Soares M.R., von Kruger W.M. et al. A proteome reference map for *Vibrio cholerae* El Tor. *Proteomics.* 2004; 4: 1491–504.
 33. Yan X., Xiao D., Zhao F., Gu Y., Meng F., Zhang J. Analysis of exoproteins of El Tor *Vibrio cholerae* by 2DE and MALDI-TOF-MS/MS. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2009; 49(6): 746–58.
 34. Kováčik V., Bekesová S., Pätoprstý V., Rehulka P., Chmelík J., Kovác P. Positive-ion fragmentation in matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time of flight mass spectrometry of synthetic analogs of the O-specific polysaccharide of *Vibrio cholerae* O:1. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2006; 12(4): 247–52.
 35. Hazen T.H., Martinez R.J., Chen Y., Lafon P.C., Garrett N.M., Parsons M.B. et al. Rapid Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(21): 6745–56.
 36. Dieckmann R., Strauch E., Alter T. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 109: 199–211.
 37. Eddabra R., Prévost G., Scheffel J.-M. Rapid discrimination of environmental *Vibrio* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol. Res.* 2012; 167: 226–230.
 38. Emami K., Askari V., Ullrich M., Mohinudeen K., Anil A.C., Khandeparker L. et al. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One.* 2012; 7(6): e38515.
 39. Oberbeckmann S., Wichels A., Maier T., Kostrzewa M., Raffelberg S., Gerdt G. A polyphasic approach for the differentiation of environmental *Vibrio* isolates from temperate waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011; 75: 145–62.
 40. Malainine S.M., Moussaoui W., Prévost G., Scheffel J.M., Mimouni R. Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish, sea water and sediments of the Khnifiss lagoon, Morocco, by MALDI-TOF mass spectrometry. *Lett. Appl. Microbiol.* 2013; 56: 379–86.
 41. Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Остяк А.С., Басов Е.А., Куликалова Е.С., Хунхеева Ж.Ю. и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ в экспресс-идентификации микроорганизмов рода *Vibrio*. В кн.: *Материалы XI Межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на ЧС в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера»*. Саратов; 2012: 160–2.
Mironova L., Afanas'ev M., Ostyak A., Basov E., Kulikalova E., Хунхеева Ж.Ю. Urbanovich L. et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid *Vibrio* spp. Identification. In: *Modern technologies in the improvement of preventive measures and response to emergencies in the area of public health sanitary-epidemiological nature: Proceedings XI Interstate scientific-practical conference*. Saratov; 2012: 160–62. (in Russian)
 42. Afanas'ev M., Mironova L., Ostyak A., Basov E., Kulikalova E., Urbanovich L. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid, easy and reliable *Vibrio cholerae* identification. In: *23rd ECCMID*. 2013, 27–30 April 2013, Berlin, Germany.
 43. Телесманич Н.Р., Чайка И.А., Агафонова В.В., 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. В кн.: *Холера и патогены. для человека вибрионы. Материалы Совещания специалистов Роспотребнадзора в г. Ростове-на-Дону (5–6 июня 2013 г.)*. Ростов-н/Д: Дониздат; 2013; вып. 26: 143–8.
Telesmanich N.R., Chayka I.A., Agafonova V.V., Seina S.O., Chemisova O.S., Goncharenko E.V. et al. MALDI mass spectrometry analysis in typing and intraspecific differentiation of *V. cholerae* based on the creation a reference library of proteomic profiles In: *Cholera and pathogen. for human vibrios: Proceedings of the meeting of specialists of Rosпотребнадзор: Rostov-on-Don*. 5–6 June 2013; 26: 143–8. (in Russian)
 44. Beasley A.S., Cotter R.J., Vogel S.N., Inzana T.J., Qureshi A.A., Qureshi N. A variety of novel lipid A structures obtained from *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Innate Immun.* 2012; 18(2): 268–78.
 45. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Spletstoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 1061–9.
 46. Muller W., Hotzel H., Otto P., Karger A., Bettin B., Bocklisch H. et al. German *Francisella tularensis* isolates from European brown hares (*Lepus europaeus*) reveal genetic and phenotypic diversity. *BMC Microbiol.* 2013; 13: 61.
 47. Couderc C., Nappes C., Drancourt M. Comparing inactivation protocols of *Yersinia* organisms for identification with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012; 26: 710–4.
 48. Drevinek M., Dresler J., Klimentova J., Pisa L., Hubalek M. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 2012; 55(1): 40–6.
 49. *MALDI Biotyper 3.0 User Manual. Review 2.* (Bruker Daltonics, Germany. 2011).
 50. Ostyak A., Afanas'ev M., Balakhonov S. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry-based system for high throughput identification of *Yersinia pestis*. In: *23rd ECCMID*. 2013, 27–30 April 2013, Berlin, Germany.

Поступила 17.12.13

Received 17.12.13

MALDI-TOF MS ANALYSIS FOR YERSINIA PESTIS, VIBRIO CHOLERA, AND FRANCISELLA TULARENSIS IDENTIFICATION

M. V. Afanas'ev, L. V. Mironova, and S. V. Balakhonov

Irkutsk Antiplague Research institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia

Numerous studies showed that a new technology for the clinical microbiology laboratories, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF MS), allows fast, accurate, and effective identification of most clinically relevant microorganisms to be implemented. In the present review, we discuss applications of this approach for identification and typing of extremely dangerous pathogens – *Yersinia pestis*, *Vibrio cholera*, and *Francisella tularensis*, including the advantages and disadvantages of the method, sample preparation and biosafety problems.

Key words: MALDI-ToF MS-analysis, MALDI-ToF MS-identification, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholera*, *Francisella tularensis*