

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.932-074:543.42.062

Чайка С.О., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МАРКЁР ВИРУЛЕНТНОСТИ *VIBRIO CHOLERAE*

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кафедра общей и клинической биохимии № 1, 344022, Ростов-на-Дону, Россия

Цель исследования – выявление масс-спектрометрических протеомных маркёров токсигенности V. cholerae для разработки экспресс-диагностики возбудителя в формате MALDI-ToF. Компьютерному анализу подвергли масс-спектрометрические электронные паспорта 140 штаммов V. cholerae с заведомо известной характеристикой штаммов, которые были разделены на две основные группы по параметру наличия или отсутствия гена холерного токсина (ctx- и ctx+). Впервые выявлен таксон – специфический маркёрный белковый пик, имеющий мол. массу 3202 Da, характерный для штаммов V.cholerae ctx+ и нехарактерный для V.cholerae ctx-.

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

Для цитирования: Чайка С.О., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М. Масс-спектрометрический маркёр вирулентности *Vibrio cholerae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(7): 445-449. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-445-449>

Chaika S.O., Telesmanich N.R., Lomov Yu.M.

MASS SPECTROMETRY VIRULENCE MARKER *VIBRIO CHOLERAE*

Rostov-on-Don State Medical University, chair of biochemistry №1, 344022, Rostov-on-Don, Russian Federation

Identification mass-spectrometry of marker proteins of toxicity of V. cholerae for development the express of diagnostics of the causative agent of cholera on the basis of the computer analysis in the MALDI-ToF format of electronic profiles became the purpose of our research. Subjected to the computer analysis mass and spectrometer electronic passports 140 of strains of V. cholerae with obviously known characteristic of strains which were divided into 2 basic groups in the parameter of existence or lack of a gene of cholera toxin (ctx-and ctx+). We for the first time revealed a taxon - the specific marker protein ceous peak having a molecular mass of 3202 Da characteristic of strains of V.cholerae ctx + and unrepresentative for V.cholerae ctx-.

Key words: *Vibrio cholerae*; MALDI-TOF mass-spectrometry; proteomic analysis, toxicity cholerae

For citation: Chaika S.O., Telesmanich N.R., Lomov Yu.M. Mass spectrometry virulence marker *Vibrio cholerae*. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (7): 445-449 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-445-449>

For correspondence: Chaika S. O., graduate student ; e-mail: sofik1988@yandex.ru

Information about authors:

Chaika Sofya Olegovna <http://orcid.org/0000-0002-0270-3143>

Telesmanich Natalya Robertovna <http://orcid.org/0000-0002-1906-6312>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 22.02.2018

Accepted 03.04.2018

Введение. Из масс-спектрометрических методов для изучения протеома микроорганизмов широко используется метод времяпролётной масс-спектрометрии на базе матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (англ. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – MALDI) с времяпролётным разделением (англ. Time of Flight – ToF) ионов (MALDI-ToF-MS). Можно выделить два основных технологических приёма, основанных на времяпролётной спектрометрии. В основе одного из них лежит предварительное разделение белков путём двумерного электрофореза с последующей тандемной масс-спектрометрией (MS-TOF-TOF). Такой анализ позволяет идентифицировать белки не только клеток, но и

тканей путём фингерпринта [1–5]. В основе второго подхода лежит прямое белковое профилирование клеток микроорганизмов и получение виртуального «облика» клетки, её протеомного спектра, минуя отдельный этап разделения белков. Диапазон изучаемых масс рибосомальных белков лимитирован 2000–18000 Da, что достигается использованием в качестве матрицы α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, этот подход лежит в основе идентификации микроорганизмов [2]. Данный масс-спектрометрический метод ограничивается коммерческой базой данных, в которую не входит вид *Vibrio cholerae* [6, 7] Все штаммы холерных вибрионов, исследуемые на масс-спектрометре, определялись как *Vibrio albensis* с высокой степенью достоверности [8]. Точная идентификация холерных вибрионов становится возможной только после внесения протеомных профилей одного или двух представителей в базу данных Biotyper. Достоверные результаты идентифика-

Для корреспонденции: Чайка Софья Олеговна, аспирант кафедры общей и клинической биохимии № 1; e-mail: sofik1988@yandex.ru

ции вибрионов описаны в ряде работ [2, 8–11]. Линейная масс-спектрометрия микроорганизмов – экспресс-метод идентификации до вида на основе константных рибосомальных белков клетки. Наличие же в спектре и варибельных белков может дать возможность характеризовать такие признаки бактерий внутри вида, как токсигенность, наличие или отсутствие других признаков вирулентности, характеризующих возможную тяжесть течения инфекционного процесса. Эти характеристики обычно конкретизируются с помощью бактериологических методов или ПЦР-анализа [12–14]. Перспективы внутривидовой масс-спектрометрической дифференциации становятся возможными при создании виртуальных музеев – коллекций микроорганизмов [8, 15, 16]. Они должны содержать информацию не только о комплексе молекулярных масс белков, большого количества штаммов представителей отдельных групп вида, но и их гено-фенотипическую характеристику [8, 15]. Такой комплекс информации даёт возможность определить не только маркёрные белки вирулентности, но и происхождение штаммов и их филогенетическое родство на основе построения дендрограмм. Протеомные MALDI-ToF-MS зеркально отображают дендрограммы на основе VNTR-типирования [2, 8]. Информация, включающая конечный результат в виде таксономической идентификации микроорганизмов и их происхождение, базируется на детальной характеристике графических спектров и таблиц (MSP - Peak List). Биохимический профиль клетки в виде протеомного спектра и его числовых характеристик интересен с научной точки зрения, он является метаболическим «отпечатком пальцев» представителя. На основе визуального или компьютерного анализа можно установить сходство и отличия клеток штаммов внутри вида. При этом исследователями делается попытка выявить маркёрный белок или комплекс белков, характерных для определённой группы штаммов, объединённых общим признаком [9, 11, 12, 17]. Таким маркёром для *V. cholerae* мог бы стать белок OmpU, обнаруживаемый масс-спектрометрическим путём, при использовании другой матрицы и перенастройки параметров прибора. Нестандартная пробоподготовка и несоответствие массы белка OmpU ($m/z = 34565$ Da) и диапазона масс для идентификации (2000–18000 Da) значительно усложняют методику [18]. На данный момент не описан подход к выявлению токсигенных холерных вибрионов в процессе идентификации или на основе уже идентифицированных микроорганизмов при помощи линейной масс-спектрометрии в диапазоне мол. масс 2000–18000 Da при использовании α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, что является стандартной пробоподготовкой. Встречаются работы, в которых описаны попытки сделать это, но осуществить внутривидовую дифференциацию по эпидемиологической значимости штаммов *V. cholerae* не удалось [19].

Для возможного выявления белка или комплекса белков, характерных для токсигенных штаммов *V. cholerae*, все электронные протеомные паспорта возбудителей холеры были разделены на две группы по параметру – наличия или отсутствия гена холерного токсина.

Цель исследования – выявление масс-спектрометрических протеомных маркёров токсигенности *V. cholerae* для разработки экспресс-диагностики возбудителя в формате MALDI-ToF.

Материал и методы. Работа проведена на масс-спектрометре MALDI-ToF Bruker Daltonics. Профили получали с помощью программ Flex control и Biotyper 3.0. В качестве матрицы использована α -циано-4-гидроксикоричная кислота, позволяющая получить спектр в диапазоне мол. масс 2000–18000 Da, которые лежат в основе биотипирования. Масс-спектрометрический профиль микроорганизма представляет собой график, на котором по оси абсцисс отложены масс-заряды (m/z) (молекулярные массы), а по оси ординат – интенсивность пика (т. е. количество белка с конкретной молекулярной массой, выражающейся в процентах).

Интенсивность (количество белка) оценивается относительно самого высокого 100% пика (наибольшего количества какого-то конкретного белка). Значение масс-заряда (m/z) можно приравнять к значению массы, так как заряд равен 1 ($z = 1$; $m/1 = m$). Ограничение диапазона масс 2000–18000 Da.

Масс-спектр, состоящий из пиков разной интенсивности, является графическим отображением масс-пик листа (MSP - Peak List), который представляет собой таблицу всех молекулярных масс полученных профилей каждого штамма. Этот электронный паспорт отражает числовую характеристику протеомного спектра микроорганизма, около 70 наиболее значимых для каждого штамма белков в графике. Паспорт имеет вид таблицы, в первом столбце которой показана масса белков (Da) ($m=m/z$), во втором – интенсивность пика (%). Интенсивность пика отражает процентное соотношение количества белков с конкретной массой относительно максимального. Например 100% пик указывает на то, что белок с конкретной массой присутствует в данном образце в максимальном количестве, остальные соотносятся в сравнении с данной величиной.

Анализ производился при помощи программы Microsoft Excel.

Компьютерному анализу подвергали масс-спектрометрические паспорта штаммов *V. cholerae* ($n = 140$), с заведомо известной характеристикой (биовар, серогруппа, серотип, год, место и объект выделения, наличие генов токсигенности). Нас интересовала ПЦР-характеристика вибрионов на наличие или отсутствие гена холерного токсина (ctx+/ctx-). Из 140 охарактеризованных в ПЦР штаммов: *V. cholerae* O₁ *classica* ($n = 2$) (ctx+ 2штамма), *V. cholerae* O₁ *El Tor* ($n = 69$) (ctx+ 23штамма/ ctx- 46 штаммов), *V. cholerae* O₁₃₉ ($n = 32$) (ctx+ 17штаммов/ctx- 15штаммов), *V. cholerae* non O_{1/O₁₃₉ ($n = 37$) (ctx+ 17штаммов/ ctx- 20штаммов) (см. таблицу).}

Масс-спектрометрические паспорта MSP-Peak List переносились в ручном режиме в таблицу Microsoft Excel. Каждый столбец соответствовал характеристике одного штамма. В верхних ячейках столбца отражались сведения о фенотипической и таксономической характеристике штамма. В остальных ячейках столбца, расположенных ниже, – значения масс, характерных для данного штамма, от 3000 до 18 000 Da. Все столбцы (штаммы) разделены на две основные группы по параметру наличия или отсутствия гена холерного токсина (ctx+ и ctx-). В левой части таблицы – столбцы с параметром наличия гена, в правой – отсутствия. Проводился поиск одинаковых значений масс (+/- 2 Da) среди штаммов визуальным способом, каждому значению масс присваивался определённый цвет ячейки.

Результаты. Методика поиска одинаковых значений масс в программе Microsoft Excel позволила обратить внимание на белок с мол. массой 3202 (+/-2) Da, который присутствовал у большинства штаммов вида *V. cholerae*, охарактеризованных методом ПЦР как токсигенные. Данный белок отсутствовал практически у всех атоксигенных вариантов штаммов.

В группу токсигенных штаммов ($n = 59$) входило: 2 штамма *V. cholerae* O₁ *classica*, 23 штамма *V. cholerae* O₁ *El Tor*, 17 – *V. cholerae* O₁₃₉ и 17 – *V. cholerae* non O_{1/O₁₃₉. Среди 59 штаммов белок с массой 3202 Da встречался у 51 (86,4%) штамма, и только 8 (13,6%) штаммов не имели этого белка. Процентное соотношение наличия белка 3202 Da внутри групп (серогруппы и биовары) выглядит следующим образом: оба токсигенных штамма (100%) *V. cholerae* O₁ *classica* имели данный пик, пик присутствовал у 19 штаммов *V. cholerae* O₁ *El Tor* (82,6%), 14 штаммов *V. cholerae* O₁₃₉ (82,4%), 16 штаммов *V. cholerae* non O_{1/O₁₃₉ (94,1%) (рис. 1; см. таблицу).}}

Группа атоксигенных штаммов ($n = 81$) состояла из 46 штаммов *V. cholerae* O₁ *El Tor*, 15 – *V. cholerae* O₁₃₉ и 20 – *V. cholerae* non O_{1/O₁₃₉. Среди 81 штамма белок с массой}

Диагностическая эффективность, отражающая специфичность белка с мол. массой 3202 Da, характерного для токсигенных штаммов

Показатели		<i>V.cholerae</i> O ₁ classica	<i>V.cholerae</i> O ₁ El Tor	<i>V.cholerae</i> O ₁₃₉	<i>V.cholerae</i> non O ₁ /O ₁₃₉	Всего	
n=140	ctx+ штаммов (n = 59)	Количество / % токсигенных штаммов с наличием белка массой 3202Da +	2 / 100	23 / 82,6	14 / 82,4	17 / 94,1	51 / 86,4
		Количество / % токсигенных штаммов, у которых отсутствует белок массой 3202Da -	0 / 0	4 / 17,4	3 / 17,6	1 / 5,9	8 / 13,6
	ctx- штаммов (n = 81)	Количество / % атоксигенных штаммов, у которых отсутствует белок массой 3202Da -	0 / 0	42/91,3	15 / 100	15 / 75	72 / 88,9
		Количество / % атоксигенных штаммов с наличием белка массой 3202Da +	0 / 0	4 / 8,7	0 / 0	5 / 25	9 / 11,1

3202 Da отсутствовал у 72(88,9%) штаммов из 81, и только 9(11,1%) штаммов имели этот белок. Отсутствие белка с массой 3202 Da в группах атоксигенных штаммов представляет следующее распределение: 42 (91,3%) штамма из 46 *V. cholerae* O₁ElTor не имели данного белка. Все штаммы *V. cholerae* O₁₃₉ctx- (100%) не имели пик 3202 Da. Среди *V. cholerae* non O₁/O₁₃₉ данный пик отсутствовал у 15(75%) из 20 штаммов (рис. 2; см. таблицу).

Высокие показатели достоверности ($p = 0,021$) принадлежности белка с мол. массой 3202 Da к токсигенным вариантам свидетельствуют о том, что наличие данного белка действительно является таксон-специфическим маркёрным белком, характеризующим штамм *Vibrio cholerae* как токсигенный. Соответственно отсутствие белка указывает на атоксигенность штамма.

Следующей числовой позицией, характеризующей массу зрелой клетки, является количество данного белка, измеряемого

интенсивностью. Оценка интенсивности пиков с массой 3202 Da среди штаммов, имеющих ctx+ ген (59 штаммов), показала, что средний показатель интенсивности пика 65%, из них с показателем интенсивности 100% встречался в 19 случаях из 59. Если рассматривать средний показатель интенсивности пика среди токсигенных вариантов по группам, то он составлял: *V. cholerae* O₁classica – 78%, *V. cholerae* O₁ElTor – 70%, *V. cholerae* O₁₃₉ – 46%, *V. cholerae* non O₁/O₁₃₉ – 75% (рис. 3).

У некоторых (n=9) атоксигенных штаммов, при отсутствии гена холерного токсина (ctx⁻), присутствовал пик 3202 Da, которого не должно было быть. Анализ интенсивности пиков данных штаммов, показал среднее значение 22,4% (среднее значение в группах (биовары, серогруппы) *V. cholerae* O₁classica – 0%, *V. cholerae* O₁ElTor – 10%, *V. cholerae* O₁₃₉ – 0%, *V. cholerae* non O₁/O₁₃₉ – 33%). Высокая степень достоверности различий ($p = 0,03$) между значениями интенсивности пика в группах токсигенных и атоксигенных штаммов позволяет судить о влиянии интенсивности пика на характеристику токсигенности штамма (см. рис. 3).

Наличие белка с массой 3202 Da является таксонспецифическим маркёром наличия ctx гена, что подтверждается в

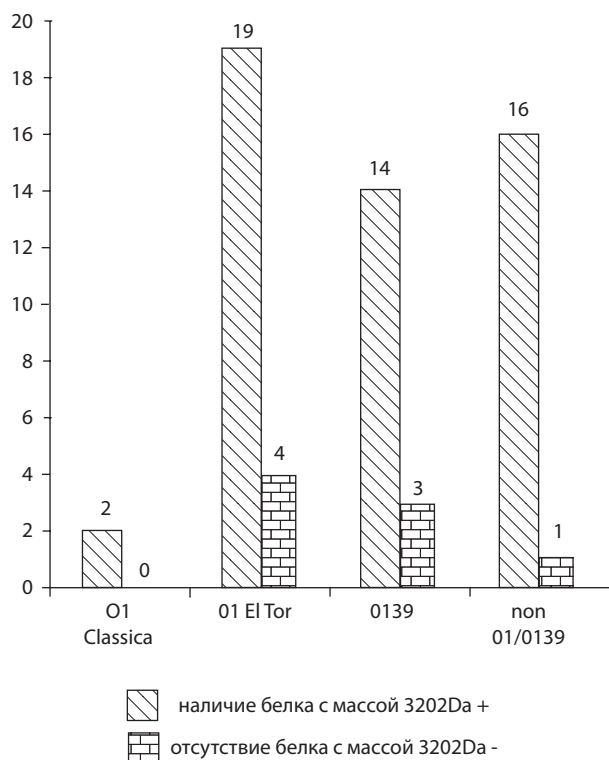


Рис. 1. Количественное соотношение среди токсигенных штаммов *V.cholerae* с наличием и отсутствием белка массой 3202 Da ctx+ (n = 59).

По оси абсцисс – биовары, серогруппы *V.cholerae* ctx+, столбцы собраны в пары по признаку наличия и отсутствия маркёрного белка; по оси ординат – количество штаммов.

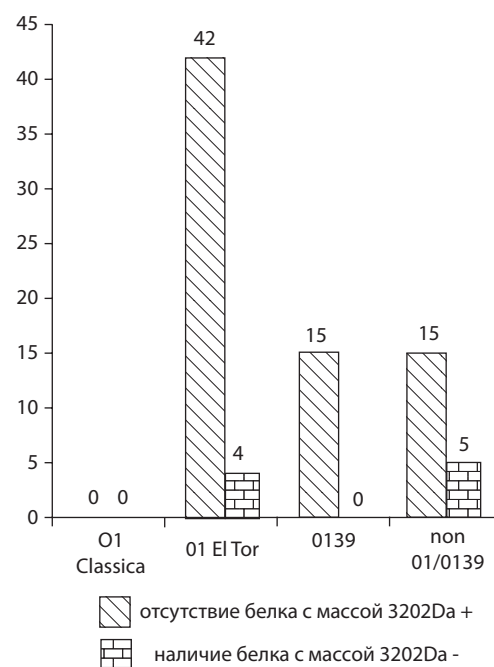


Рис. 2. Количественное соотношение среди атоксигенных штаммов *V.cholerae* с отсутствием и наличием белка массой 3202 Da ctx- (n = 81).

По оси абсцисс – биовары, серогруппы *V.cholerae* ctx-, столбцы собраны в пары по признаку наличия и отсутствия маркёрного белка; по оси ординат – количество штаммов.

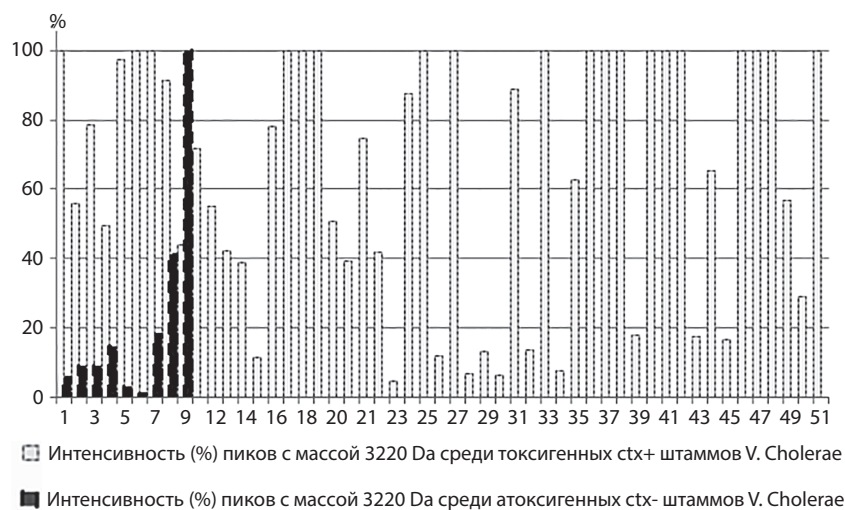


Рис. 3. Интенсивность (в %) пиков с массой 3202 Da среди токсигенных и атоксигенных штаммов *V. cholerae*.

По оси абсцисс – порядковые номера штаммов, имеющих белок массой 3202 Da; по оси ординат – интенсивность (в %) пиков

123 (88%) случаях из 140 среди токсигенных и атоксигенных штаммов вместе взятых, это свидетельствует о высокой диагностической эффективности метода. За пределы нашей теории выходит 17(12%) штаммов из 140, все эти штаммы относятся к разным годам и местам выделения. Среди них 8 штаммов *V. cholerae* *O*₁ElTor (4 ctx⁺/4 ctx⁻), 3 штамма *V. cholerae* *O*₁₃₉ (3 ctx⁺), 6 штаммов *V. cholerae* non *O*₁/*O*₁₃₉ (1 ctx⁺/5 ctx⁻).

Обсуждение. Выявление маркерных белков внутри вида и их принадлежность к определённой таксономической группе становится возможным благодаря созданию баз данных, в которые закладываются автором персонализированные таксономические параметры, генетические характеристики токсигенности, что поможет сориентироваться в определении эпидемической значимости [9, 11, 12, 17]. Наличие масс-спектрометрических электронных паспортов штаммов даёт уникальную возможность – изучать молекулярно-биохимические параметры микроорганизма в виртуальном формате. Сравнивая масс-спектры между собой, можно производить внутривидовые исследования, выявлять маркерные белки патологического процесса. Это в последние годы стало отражаться в публикациях, посвящённых изучению отдельных белков на масс-спектрометре в линейном режиме. Благодаря созданию таких баз данных получены масс-спектрометрические белковые профили штаммов возбудителей бруцеллёза, что позволило выявить 12 возможных родоспецифических фрагментов белков [20]. Коллекция масс-спектров *E. coli* позволила установить маркерные белки, отличающие гемолитическую вирулентную популяцию, вызывающую дискинезию желчевыводящих путей, от негемолитической по наличию пика *m/z* 9000 Da и идентифицировать эшерихии, вызывающие дисфункциональные нарушения желчевыводительной системы. При восстановлении функционирования желчевыводительной системы гемолитический признак у эшерихий исчезает, что соответствует исчезновению пика с *m/z* 9000 Da и появлению негемолитических форм с доминирующим комплексом белков, имеющих *m/z* 5700 Da [12]. Проведён масс-спектрометрический анализ представителей рода *Yersinia*. Обнаружены два специфических пика, характерных для подвида *pestis* (*m/z* 3064 и *m/z* 5796), один – для подвида *caucasica* (*m/z* 3237). Маркер *m/z* 3064 регистрировался только у вирулентных штаммов *Y.pestis* [19]. Что касается *V. cholerae*, то все исследуемые на масс-спектрометре штаммы опреде-

лялись как *V. albensis* с высокой степенью достоверности. Компьютерный анализ в формате MALDY-ToF данного штамма показал, что протеом спектра демонстрирует существенные отличия, при том что не отличается по таксономическим признакам от представителей *V. cholerae* [21]. Внесение в коммерческую базу нескольких штаммов *Vibrio cholerae*, позволяет проводить идентификацию возбудителей холеры. Внутривидовое типирование, установление филогенетического родства и происхождения штаммов холерных вибрионов, появления которых на территории Российской Федерации носит заносной характер, невозможны без расширенной библиотеки спектров рибосомальных белков представителей вида *V. cholerae*. [8]. По данным литературы осуществить внутривидовую дифференциацию по эпидемической значимости, серогруппе, биовару не удалось [19]. В нашей работе такую закономерность удалось найти.

Ранее опубликованы данные о выявлении маркерного белка OmpU (*m/z* = 34565 Da) масс-спектрометрическим методом, в работе использовалась матрица – феруловая кислота (3-метокси-4-гидроксикоричная кислота, Ferulic Acid), позволяющая расширить диапазон изучаемых масс до 80 000 Da. Принадлежность найденной авторами массы 34 565 Da к белку наружной мембраны OmpU доказана методом масс-спектрометрии с выделением чистого белка путём двухмерного электрофореза. Нами использована матрица α -циано-4-гидроксикоричная кислота, предназначенная для стандартной методики масс-спектрометрии микроорганизмов и идентификации в диапазоне 2000–1800 Da. При этом коммерческие базы данных протеомов микроорганизмов созданы с применением матрицы на основе α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, следовательно, идентификация с использованием другой матрицы станет невозможной, так как разные диапазоны масс не смогут соотноситься друг с другом. Минусом данной методики является то, что для выявления белка OmpU (*m/z* = 34 565 Da) необходимо два этапа исследования. Первый этап – определение вида микроорганизма стандартным методом с матрицей, предназначенной для идентификации при определённых настройках прибора. Второй этап – это повторное нанесение образца на мишень с другой матрицей и перенастройка параметров прибора, что усложняет процесс. Теряются основные преимущества метода линейной масс-спектрометрии – быстрота и простота процесса [18]. В нашем случае невозможно говорить о каком-то конкретном белке. Выявлен специфический маркерный белковый пик с мол. массой 3202 Da, характерный для штаммов *V. cholerae* ctx⁺ и нехарактерный для *V. cholerae* ctx⁻, что подтверждается в 88% выборки. Обнаружение данного маркерного белка в MALDI масс-спектре может стать поводом для проведения генетической оценки токсигенности штаммов.

Показатель интенсивности обнаруженного пика отражает характеристику токсигенности штамма; так, средний показатель среди ctx⁺ штаммов составляет 65% против 22,4% у атоксигенных вариантов, где пика не должно быть. В группе токсигенных штаммов 19 из 59 имеют пик со 100% интенсивностью, в редких случаях встречаются низкие показатели. Среди всех атоксигенных штаммов, у которых белок все же присутствует, только у одного встречается максимальный показатель интенсивности пика (100%) (см.рис. 3).

Обнаружение пика с массой 3202 Da при помощи созданной базы данных и компьютерного анализа спектра протеома поможет определить эпидемическую значимость штаммов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–5, 10, 11, 18
см. REFERENCES)

1. Кульшань Т.А., Заднова С.П., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И. Оценка функциональных особенностей и стрессоустойчивости изогенных токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; (3):11-7.
2. 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): 249-56
6. Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Басов Е.А., Остяк А.С., и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ в ускоренной идентификации микроорганизмов рода *Vibrio*. *Молекулярная генетика, микробиология, вирусология*. 2014; (3): 22-9.
7. Дегушев К.В., Хомяков А.Е., Тюрин Е.А. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе Microflex (Bruker Daltonik) для идентификации белковых спектров ПБА I-II групп. *Молекулярная диагностика*. 2014; 1: 444.
8. 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): 375-9.
9. Миронова Л.В., Басов Е.А., Афанасьев М.В. и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ с молекулярно-генетической идентификацией *Vibrio* spp. в системе мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19 (6): 27-36.
12. Гапон М.Н., Телесманич Н.Р., Терновская Л.Н., Чайка С.О., Чайка И.А., Микашинович З.И., Твердохлебова Т.И. Времяпрелетная масс-спектрометрическая внутривидовая диагностика штаммов эшерихий, выделенных от человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (6): 371-4.
13. Гапон М.Н., Телесманич Н.Р., Терновская Л.Н., Чайка С.О., Чайка И.А., Микашинович З.И. Протеомный масс-спектрометрический анализ свежее выделенных штаммов патогенных эшерихий. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии*. 2015; 3: 83-8.
14. Телесманич Н.Р., Гончаренко Е.В., Чайка С.О., Чайка И.А., Теличева В.О. Возможности применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для изучения углевод - специфических рецепторов диагностического бактериофага эльтор. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; (2): 85-90.
15. Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Чайка И.А. Расширение возможностей линейной MALDI масс-спектрометрии для анализа протеома микроорганизмов на основе создания референс - библиотеки виртуальных профилей. *Актуальные вопросы современной медицины. Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции*. Екатеринбург. Инновационный центр развития образования и науки. 2015; 2: 34-7.
16. Зуева Е.В., Стоянова Н.А., Токаревиц Н.К. Применение метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для контроля коллекции штаммов *Leptospira*, используемых в серодиагностике лептоспироза. *Молекулярная диагностика*. 2014; 1: 510-1.
17. Осипов Г.А., Родионов Г.Г. Применение метода масс-спектрометрии микробных маркеров в клинической практике. *Лабораторная диагностика*. 2013; (2): 68-73.
19. Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Басов Е.А., Остяк А.С., Вдовиченко Г.В., Климов В.Т., Богумильчик Е.А., Балахнов С.В. Масс-спектрометрический анализ межвидовой и внутривидовой дифференциации микроорганизмов *Yersinia* spp. И *Vibrio* spp. *Молекулярная диагностика*. 2014; (1): 477-8.
20. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Головнева С.И., Чеботарева Е.В. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации *Brucella* spp. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2014; (25): 111-3.
21. Воляницкая 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; 4 (9) : 82-9.

REFERENCES

1. Kulshan T.A., Zadnova S.P., Cheldyishova N.B., Smirnova N.I. Evaluation of functional features and stress resistance of isogenic toxigenic and non-toxicogenic biovar *El Tor Vibrio cholerae* strains. *Zhurnal mikrobiologii i immunologii*. 2015; (3):11-7. (in Russian)
2. Bocharova Yu.A., Chebotar I.V., Mayanskiy N.A. The possibilities, problems and perspectives of mass-spectrometry in medical microbiology:

publications review. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61 (4): 249-56. (in Russian)

3. Zou Q., Yan X., Li B., Zeng X., Zhou J., Zhang J. Proteome analysis of sorbitol fermentation specific protein in *Vibrio cholerae* by 2-DE and MS. *Proteomics*. 2006; Mar;6(6):1848-55.
4. 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. *Acta microbiologica Sinica*. 2009; Jun;49(6):746-58.
5. Ruibai Wang, Hongzhi Zhang, Haiyan Qiu, Shouyi Gao, Biao Kan. Proteins involved in difference of sorbitol fermentation rates of the toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* El Tor strains revealed by comparative proteome analysis. *BMC Microbiology*. 2009; 9: 135-44.
6. Afanasev M.V., Mironova L.V., Basov E.A., Ostyak A.S., Kulikalova E.S., Urbanovich L.Ya., Balahnov S.V. MALDI-TOF mass spectrometry in the accelerated identification of microorganisms of the *Vibrio* genus. *Moлекулярная генетика, микробиология i вирусология*. 2014; (3): 22-9. (in Russian)
7. Detushev K.V., Homyakov A.E., Tyurin E.A. Application of MALDI - TOF of a mass spectrometry on the Microflex device (Bruker Daltonik) for identification of proteinaceous ranges of PBA I-II of groups. *Moлекулярная диагностика*. 2014; 1: 444. (in Russian)
8. Telesmanich N.R., Chaika S.O., Chaika I.A., Goncharenko E.V., Lomov Yu.M. The mass-spectrometric analysis of MALDI-TOF in identification and typing of strains of comma bacillus. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61 (6): 375-9 (in Russian)
9. Mironova L.V., Basov E.A., Afanasev M.V., Hunheeva Zh.Yu. MALDI-ToF mass spectrometry analysis with molecular genetics identification of *Vibrio* spp. in the system of the monitoring of vibrio flora of surface water reservoirs. *Epidemiologiya i infektzionnyie bolezni*. 2014; 19 (6): 27-36. (in Russian)
10. Dieckmann R., Strauch E., Alter T. Rapid identification and characterization of *Vibri* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of applied microbiology*. 2010; Jul;109(1):199-211.
11. Kaveh Emami, Vahid Askari, Matthias Ullrich, Khwajah Mohinudeen, Arga Chandrashekar Anil, Lidita Khandeparker, J. Grant Burgess, Ehsan Mesbahi. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS ONE*. 2012; 7(6): e38515.
12. Gapon M.N., Telesmanich N.R., Ternovskaya L.N., Chaika S.O., Chaika I.A., Mikashinovich Z.I., Tverдохлебова T.I. The time-of-flight mass spectrometer intra-specific diagnostic of strains of *Escherichia* isolated from patient. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61 (6): 371-4. (in Russian)
13. Gapon M.N., Telesmanich N.R., Ternovskaya L.N., Chaika S.O., Chaika I.A., Mikashinovich Z.I. Proteomic Mass-Spectrometric analysis of freshly isolated *Escherichia coli* strains. *Zhurnal mikrobiologii i immunologii*. 2015; 3: 83-8. (in Russian)
14. Telesmanich N.R., Goncharenko E.V., Chaika S.O., Chaika I.A., Teli-cheva V.O. The possibilities of application of MALDI-TOF mass-spectrometry for investigation of carbohydrate-specific receptors of diagnostic bacteriophage El Tor. *Zhurnal mikrobiologii i immunologii*. 2016; 2: 85-90. (in Russian)
15. Telesmanich N.R., Chaika S.O., Chaika I.A. Expansion of opportunities of the linear MALDI of a mass spectrometry for the analysis of a proteom of microorganisms on the basis of creation the reference - libraries of the virtual profiles. *Aktualnyie voprosy i sovremennoy meditsiny. Sbornik nauchnyih trudov po itogam mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii*. Yekaterinburg, Innovatsionnyy tsentr razvitiya obrazovaniya i nauki. 2015; 2: 34-7. (in Russian)
16. Zueva E.V., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K. Application of the MALDI-TOF method of a mass spectrometry for monitoring of a collection of strains of *Leptospira* in se-rodiaagnostics of leptospirosis. *Moлекулярная диагностика*. 2014; 1: 510-1. (in Russian)
17. Osipov G.A., Rodionov G.G. Use of a method of a mass spectrometry of microbial markers in clinical practice. *Laboratornaya diagnostika*. 2013; (2): 68-73. (in Russian)
18. Paauw A., Trip H., Niemcewicz M., Sellek R., Heng J.M., Mars-Groenendijk R.H. et al. OmpU as a biomarker for rapid discrimination between toxigenic and epidemic *Vibrio cholerae* O1/O139 and nonepidemic *Vibrio cholerae* in a modified MALDI-TOF MS assay. *BMC Microbiol*. 2014; 14: 158.
19. Afanasev M.V., Mironova L.V., Basov E.A., Ostyak A.S., Vdovichenko G.V., Klimov V.T., Bogumilchik E.A., Balahnov S.V. Mass-spectrometry analysis of trans-species and intraspecific differentiation of microorganisms of *Yersinia* spp. and *Vibrio* spp. *Moлекулярная диагностика*. 2014; 1: 477-8. (in Russian)
20. Ulshina D.V., Kovalev D.A., Golovneva S.I., Chebotareva E.V. Application of MALDI-TOF mass spectrometry to *Brucella* spp. identification. *Dalnevostochny zhurnal infektzionnoy patologii*. 2014; (25): 111-3. (in Russian)
21. Vodyanitskaya S. Yu., Telesmanich N.R., Chaika S.O., Chaika 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; 4 (9) :82 -9. (in Russian)

Поступила 22.02.18

Принята к печати 03.04.18