

# MALDI-ToF масс-спектрометрическое определение видовой принадлежности патогенов в совершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями

С.В.Балахонов, Л.В.Миронова, М.В.Афанасьев, Е.С.Куликалова, А.С.Остяк

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,  
Иркутск, Российская Федерация

Проведено комплексное исследование эффективности использования MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа для определения таксономической принадлежности культур *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis* в рамках эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями. Установлена высокая информативность видовой идентификации патогенов на основании профиля константных белков микробной клетки с применением расширенной базы данных MALDI Biotyper 3,0 при оперативном эпидемиологическом анализе и ретроспективном исследовании коллекционных изолятов.

**Ключевые слова:** эпидемиологический надзор, чума, холера, туляремия, MALDI-ToF масс-спектрометрия, ускоренная идентификация

**Для цитирования:** Балахонов С.В., Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Куликалова Е.С., Остяк А.С. MALDI-ToF масс-спектрометрическое определение видовой принадлежности патогенов в совершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями. Бактериология. 2016; 1(1): 88–94. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-88-94

## MALDI-ToF mass-spectrometric detection of pathogen specific belonging in improvement of epidemiological surveillance for dangerous infectious diseases

S.V.Balakhonov, L.V.Mironova, M.V.Afnas'ev, E.S.Kulikaloa, A.S.Ostyak

Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Irkutsk, Russian Federation

A complex research of mass-spectrometric MALDI-ToF efficiency was conducted to detect the taxonomic belonging of *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis* cultures in the network of epidemiological surveillance for dangerous infectious diseases. High information value of the pathogen specific identification on the basis of the constant protein profile of a microbial cell was determined using the extended database MALDI Biotyper 3,0 in operative epidemiological analysis and retrospective examination of the collection isolates.

**Key words:** epidemiological surveillance, plague, cholera, tularemia, MALDI-ToF mass-spectrometry, accelerated identification

**For citation:** Balakhonov S.V., Mironova L.V., Afnas'ev M.V., Kulikalova E.S., Ostyak A.S. MALDI-ToF mass-spectrometric detection of pathogen specific belonging in improvement of epidemiological surveillance for dangerous infectious diseases. Bacteriology. 2016; 1(1): 88–94. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-88-94

**В** системе эпидемиологического надзора за опасными инфекционными заболеваниями в РФ значимая роль отводится оперативному определению видовой принадлежности возбудителей, обеспечивающему своевременное принятие управленческих решений по необходимому ком-

плексу и объему профилактических и противозидемических мероприятий. При этом эффективность диагностической подсистемы эпидемиологического надзора определяется интеграцией в национальную систему лабораторной диагностики современных молекулярных технологий инди-

### Для корреспонденции:

Балахонов Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Адрес: 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78

Телефон: (3952) 22-0135

E-mail: chumin@mail.ru

Статья поступила 06.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

### For correspondence:

Sergei V. Balakhonov, Sc.D. (Med), Professor, Director Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor

Address: 78, ul. Trilissera, Irkutsk, 664047, Russian Federation

Phone: (3952) 22-0135

E-mail: chumin@mail.ru

The article was received 06.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

кации и идентификации патогенов [1, 2]. Применение новых высокотехнологичных подходов существенно сокращает время анализа, обеспечивает его высокую чувствительность и специфичность при существенном повышении информативности.

Один из таких подходов – прямое белковое профилирование с использованием MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с время-пролетным разделением) масс-спектрометрического анализа. Суть MALDI-ToF масс-спектрометрии заключается в «мягкой» ионизации лазером сокристаллизованного с матрицей аналита (исследуемого образца), последующем разделении ионизированных молекул и генерации специфического спектра, характеризующего качественный состав образца. Метод в последние годы широко применяется в идентификации и молекулярном типировании микробных патогенов [3–7]. Принцип идентификации с применением MALDI-ToF MS основан на анализе белкового паттерна исследуемого микроорганизма, сопоставлении его с типовыми масс-спектрами, представленными в базе данных, и определении на основании этого таксономической принадлежности изолята [6]. Идентификация микроорганизмов по белковому профилю характеризуется высокой воспроизводимостью, специфичностью, скоростью, простотой и низкими материальными затратами на выполнение протокола [4, 6, 8].

**Цель исследования** – разработка методологических подходов и оценка эффективности применения прямого белкового профилирования в ускоренной идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии.

### Материалы и методы

В работе использовано 104 штамма *Y. pestis*, 92 – *V. cholerae* и 97 – *F. tularensis*, хранящихся в музее живых культур ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и изолированных на курируемой институтом территории.

Штаммы чумного микроба выращивали на питательном агаре для культивирования микроорганизмов общего назначения, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) в течение 24 ч при 28°C, холерного вибриона – на щелочном агаре, pH 7,6 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) при 37°C в течение 18 ч, туляремийного микроба – на FT-агаре (pH 7,0) при 37°C 48 ч.

Таксономическая принадлежность взятых в исследование штаммов определялась на основании комплекса стандартных фенотипических тестов, включающих изучение тинкториальных, культурально-морфологических, биохимических, серологических и ряда других свойств.

Экстракция клеточных белков осуществлялась посредством последовательной обработки микробной взвеси этиловым спиртом, 70% муравьиной кислотой с последующим добавлением ацетонитрила. По окончании экстракции 1 мкл супернатанта переносился в лунки MSP-чипа, образцы подсушивались на воздухе, сверху наносился 1 мкл матрицы (насыщенный водный раствор  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты, содержащий 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). В качестве калибровочного стандарта и

положительного контроля анализа использовался белковый экстракт штамма *E. coli* DH5a (Bruker Daltonics, Германия). Наряду с экстракцией белков для микроорганизмов, отнесенных к III группе патогенности (*V. cholerae* не O1/O139, нетоксигенные *V. cholerae* O1), использовалось прямое нанесение культуры на MSP-чип с последующим наложением матрицы.

Для оценки биологической безопасности способа пробоподготовки использовались белковые экстракты трех штаммов каждого исследованного таксона. Дополнительно исследовались смывы с поверхности MSP-чипа с нанесенными на него белковыми экстрактами и матрицей. Исследование специфической стерильности для *V. cholerae* и *Y. pestis* проводилось в соответствии с «Инструкцией по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерного микробов», 1982 г. Стерильность белковых препаратов туляремийного микроба определялась посредством внутрибрюшинного заражения биопробных животных (белых мышей) и прямого посева на чашки с FT агаром.

Спектры собирались в автоматическом режиме на масс-спектрометре Microflex™ LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия) с использованием программы Flex Control (ver. 3.3, build 108). Для получения одиночного масс-спектра использовали 40 импульсов лазера (частота 60 Гц), анализируемый диапазон масса/заряд составлял 2000–20 000 Да. С каждой лунки чипа снимался исходный спектр, представляющий собой сумму 6 одиночных спектров (240 импульсов лазера). Для получения референсных библиотек спектров образец исследовался в 12 повторах, для идентификации – в пяти повторах. Анализ масс-спектров, генерация референсных библиотек и идентификация осуществлялись с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Германия).

Заключение о таксономической принадлежности исследуемого изолята осуществлялось на основании значения индекса совпадения (параметр score value, SV). Значение  $SV \geq 2,3$  соответствовало достоверной идентификации до вида;  $SV 2,299–2,000$  – достоверной идентификации до рода, вероятной идентификации до вида, значение  $SV$  в диапазоне 1,7–1,999 рассматривалось как вероятная идентификация до рода и менее 1,7 – недостоверный результат.

### Результаты и обсуждение

Известно, что выбор способа пробоподготовки для масс-спектрометрического анализа определяется целью исследования и предполагаемой патогенностью идентифицируемого микроорганизма. В случае работы с возбудителями особо опасных инфекций одним из критериев выбора метода подготовки проб для исследования является его обеззараживающее действие на образец. Экспериментальные исследования по оценке специфической стерильности белковых препаратов анализируемых патогенов, полученных с использованием метода экстракции муравьиной кислотой/ацетонитрилом, подтвердили его эффективную обеззараживающую способность. Отсутствие роста возбудителей чумы, холеры и туляремии при посеве белковых экстрактов и смывов с поверхности MS-чипа позволило дальнейшие исследо-

вания осуществлять в соответствии с требованиями, предъявляемыми к обеззараженному материалу.

Одним из существенных препятствий внедрения масс-спектрометрического анализа в систему лабораторной диагностики особо опасных инфекций было отсутствие в поставляемой в РФ базе данных программы MALDI Biotyper 3.0 белковых профилей соответствующих возбудителей, что определило необходимость формирования локальных библиотек референсных спектров.

Для получения референсных спектров использовались белковые экстракты типичных, охарактеризованных по комплексу культурально-морфологических, биохимических, серологических и молекулярно-генетических свойств штаммов *Y. pestis*, *V. cholerae*, *F. tularensis*. Референсный спектр каждого штамма (рис. 1–3) представляет сумму 72 одиночных спектров, соответствующих ряду критериев, в т.ч.: отношение сигнал/шум для каждого пика спектра должно быть не менее 2, количество качественных пиков – до 300, минимальная интенсивность пика – не менее 100 отн. единиц, ширина пика – 4 m/z. Генерированные суммарные референсные спектры импортировались в базу данных программы Biotyper MALDI Biotyper 3.0.

Апробация применения MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа для определения таксономической принадлежности коллекционных штаммов исследуемых патогенов показала высокую аналитическую чувствительность и специфичность метода. Для всех включенных в исследование предварительно охарактеризованных по бактериологиче-

Таблица 1. Результаты MALDI-ToF масс-спектрометрической идентификации коллекционных штаммов *Y. pestis*, *V. cholerae*, *F. tularensis*

Исходная таксономическая характеристика штаммов по микробиологическим тестам	Результаты MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа			
	количество исследованных штаммов	основной таксон	максимальное значение score value	
<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>pestis</i>	44	<i>Y. pestis</i>	2,41–2,67
	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>altaica</i>	26	<i>Y. pestis</i>	2,39–2,76
	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>hissarica</i>	2	<i>Y. pestis</i>	2,45–2,51
	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>ulegeica</i>	2	<i>Y. pestis</i>	2,33–2,42
<i>V. cholerae</i>	<i>V. cholerae</i> classica O1	2	<i>V. cholerae</i>	2,53–2,68
	<i>V. cholerae</i> eltor O1	23	<i>V. cholerae</i>	2,33–2,59
	<i>V. cholerae</i> O139	4	<i>V. cholerae</i>	2,38–2,57
	<i>V. cholerae</i> RO	2	<i>V. cholerae</i>	2,39–2,43
	<i>V. cholerae</i> не O1/O139	9	<i>V. cholerae</i>	1,98–2,69
<i>F. tularensis</i>	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>tularensis</i>	3	<i>F. tularensis</i>	2,36–2,41
	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>novicida</i>	1	<i>F. tularensis</i>	2,22
	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>mediasiatica</i>	2	<i>F. tularensis</i>	2,20–2,36
	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i>	38	<i>F. tularensis</i>	2,43–2,85

ским тестам коллекционных культур подтверждена их принадлежность к соответствующему таксону по профилю константных белков (табл. 1).

Для подавляющего большинства исследуемых штаммов индекс совпадения масс-спектров с референсными профилями базы данных превышает 2,3, что соответствует достоверной идентификации их до вида. Исключение в данной выборке составляет один изолят *V. cholerae* не O1/O139, при анализе которого определена вероятная принадлеж-

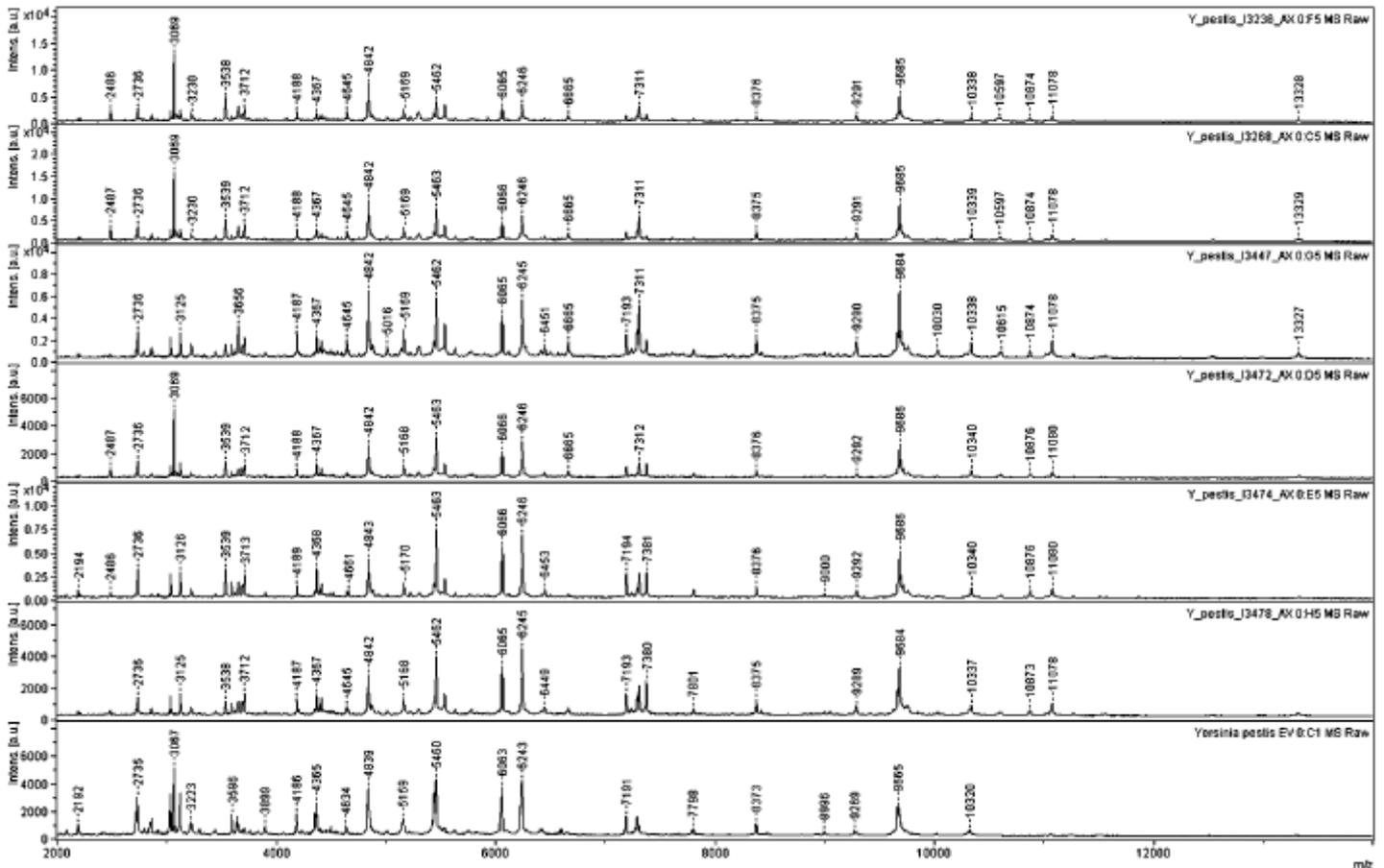


Рис. 1. Масс-спектры референсных штаммов *Y. pestis*.

ность к роду *Vibrio* (SV 1,98), что, по всей вероятности, обусловлено применением для исследования вибрионов не O1/O139 серогрупп прямого нанесения культуры на чип на этапе пробоподготовки. Не выявлено различий масс-спектрометрической идентификации культур в зависимости от длительности хранения в лиофилизированном состоянии в коллекции.

При оперативной идентификации выделенных на курируемой институтом территории штаммов в рамках деятельности Регионального центра по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней II–IV групп патогенности и Референс-Центра по природно-очаговым инфекциям, действующих на базе Иркутского научно-исследовательского противочумного института, масс-спектрометрический ана-

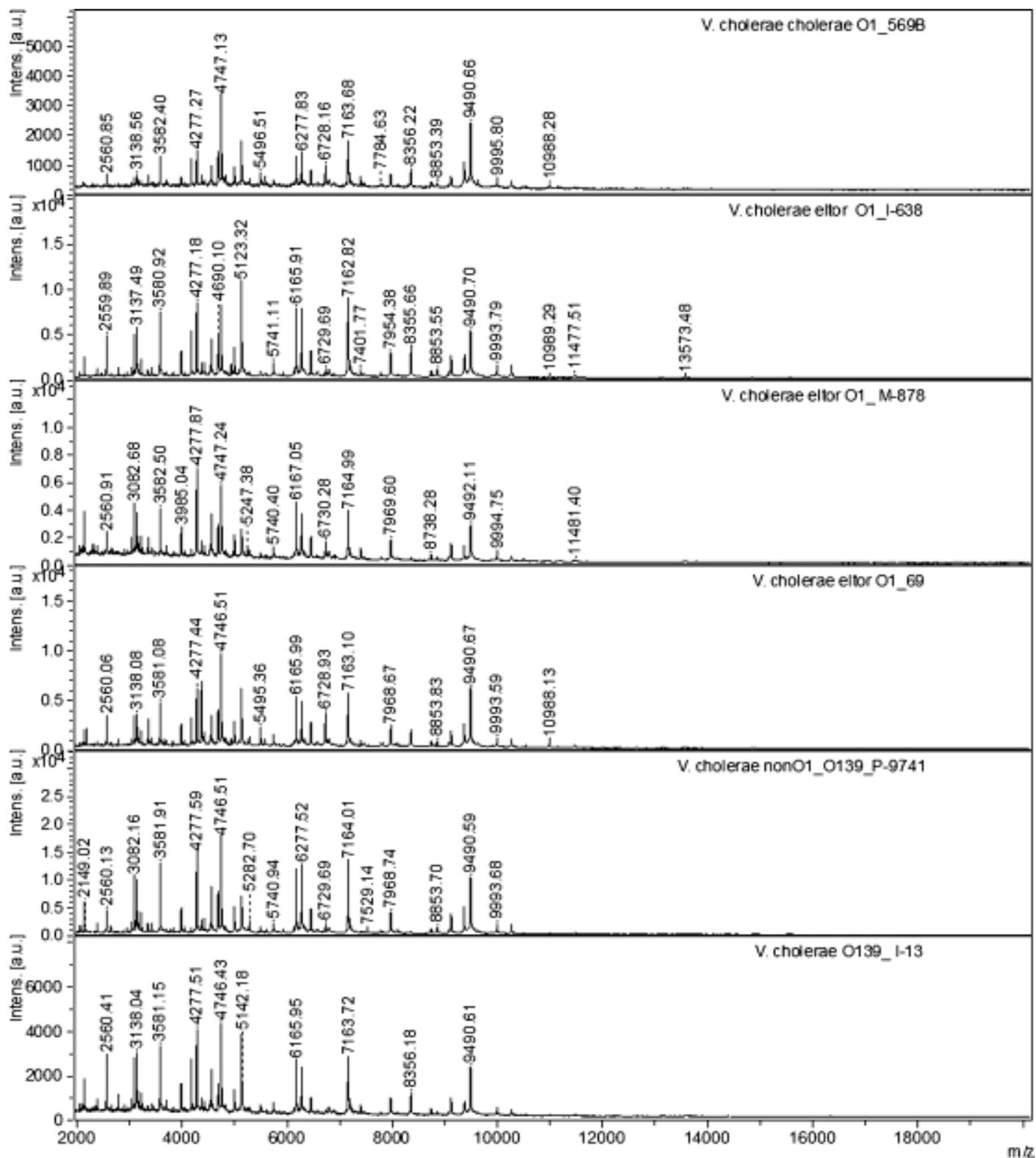


Рис. 2. Масс-спектры референсных штаммов *V. cholerae*.

лиз применяется наряду с комплексом стандартных бактериологических тестов. Всего при оперативном анализе проведено определение таксономической принадлежности 23 штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Тувинского и Алтайского природных очагов чумы, 46 штаммов *V. cholerae* из поверхностных водоемов штаммов и 47 штаммов *F. tularensis*, изолированных на курируемой территории.

В результате по профилю константных белков с высокой достоверностью подтверждена видовая принадлежность всех исследуемых культур. При этом данные масс-спектрометрической идентификации в 100% случаев совпали с данными бактериологического анализа (табл. 2).

MALDI-ToF масс-спектрометрическая идентификация использовалась при комплексном изучении изолята чумного

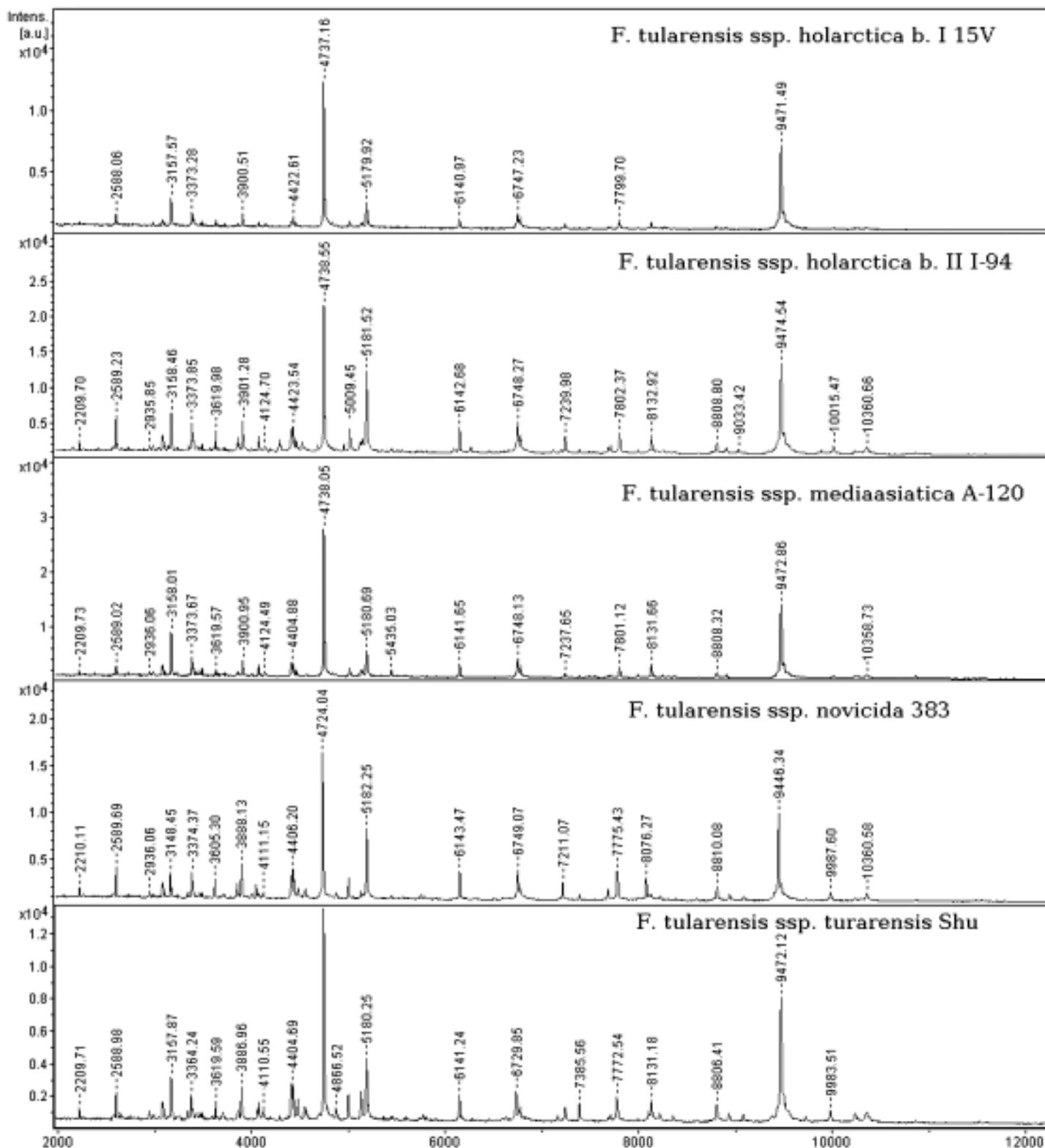


Рис. 3. Масс-спектры референсных штаммов *F. tularensis*.

Таблица 2. Результаты оперативной MALDI-ToF масс-спектрометрической идентификации штаммов *Y. pestis*, *V. cholerae*, *F. tularensis*

Таксон	Год	Территория	Количество штаммов	Результат идентификации	max SV
<i>Y. pestis</i>	2015	Республика Алтай	23	<i>Y. pestis</i>	2,43–2,61
		Алтайский край	1	<i>V. cholerae</i>	2,39
<i>V. cholerae</i>	2012	г. Иркутск	2	<i>V. cholerae</i>	2,34–3,38
		г. Тюмень	13	<i>V. cholerae</i>	2,38–2,51
		Забайкальский край	6	<i>V. cholerae</i>	2,43–2,53
		Республика Бурятия	1	<i>V. cholerae</i>	2,55
	2013	Иркутская область	1	<i>V. cholerae</i>	2,46
		Хабаровский край	2	<i>V. cholerae</i>	2,55–2,58
		Забайкальский край	6	<i>V. cholerae</i>	2,44–2,63
	2014	Алтайский край	1	<i>V. cholerae</i>	2,55
		г. Иркутск	1	<i>V. cholerae</i>	2,42
		Приморский край	3	<i>V. cholerae</i>	2,51–2,55
Забайкальский край		1	<i>V. cholerae</i>	2,57	
2015	г. Иркутск	1	<i>V. cholerae</i>	2,603	
	Забайкальский край	7	<i>V. cholerae</i>	2,44–2,57	
<i>F. tularensis</i>	2012	Красноярский край	4	<i>F. tularensis</i>	2,23–2,66
		Приморский край	1	<i>F. tularensis</i>	2,24
	2015	Красноярский край	1	<i>F. tularensis</i>	2,38
		Республика Алтай	6	<i>F. tularensis</i>	2,23–2,46
		Хабаровский край	35	<i>F. tularensis</i>	2,38–2,67

микроба эпидемиологически значимого основного подвида, впервые выделенного в Алтайском горном природном очаге чумы в 2012 г. При этом с высокой степенью достоверности установлена принадлежность указанного изолята к виду *Y. pestis* [9].

В эпидемиологическом анализе, наряду с оперативной идентификацией, необходимы изучение генетического родства изолятов, углубленная молекулярно-генетическая характеристика, направленные на реконструкцию звеньев эпидемиологической цепи и выяснение направлений заноса возбудителя на территорию.

Оценка перспектив применения MALDI-ToF масс-спектрометрии для молекулярного типирования возбудителя чумы показала возможность внутривидовой дифференциации на основе белковых паттернов штаммов основного и алтайского подвидов. Так, в масс-спектрах *Y. pestis ssp. altaica* установлено отсутствие пика со значением  $m/z$  3065 ± 2 [10], что, по всей вероятности, определяет их объединение в самостоятельную группу при кластерном анализе. Кроме того, при сравнительном исследовании масс-спектров штамм *Y. pestis*, выделенный в Горном Алтае в 2012 г., вошел в один кластер с изолятом основного подвида чумного микроба из природного очага чумы в Монголии (1988 г.), что согласуется с результатами VNTR-типирования [9] и позволяет определить возможные направления заноса на территорию РФ данного эпидемиологически значимого клона возбудителя.

Все штаммы холерного вибриона по белковым профилям дифференцируются на ряд групп, ассоциированных с некоторыми фенотипическими и эпидемиологическими характеристиками. В частности, отдельные кластеры образуют *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп, штаммы *V. cholerae eltor* O1, изолированные на вспышке холеры в г. Южно-Сахалинске в 1999 г. Однако строгих закономерностей группирования штаммов в зависимости от их биовара, токсигенных свойств, особенностей структуры детерминант вирулентности не наблюдалось [11]. Вместе с тем, MALDI-ToF масс-спектрометрия оказалась эффективным инструментом для анализа результатов минисеквенирования при идентификации генетически измененных вариантов *V. cholerae* биовара Эль-Тор [12], ко-

торые в настоящее время выступают в качестве этиологического агента холеры в мире [13].

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о высокой информативности MALDI-ToF масс-спектрометрии при определении таксономической принадлежности изолированных культур в рамках оперативного эпидемиологического анализа и ретроспективном исследовании коллекционных изолятов возбудителей опасных инфекционных болезней. Учитывая значительное сокращение сроков видовой идентификации культур в сравнении с бактериологическим анализом, высокую чувствительность и специфичность метода, внедрение его в схему лабораторной диагностики существенно повысит качество диагностической подсистемы эпидемиологического надзора за особо опасными инфекциями, а дальнейшие исследования по разработке подходов к внутривидовой дифференциации на основании белковых паттернов обеспечат применение MALDI-ToF масс-спектрометрии в качестве инструмента для молекулярного типирования патогенов.

## Литература

1. Онищенко ГГ, Ежлова ЕБ, Демина ЮВ, Мельникова АА. О мерах по совершенствованию эпидемиологического надзора в части индикации возбудителей инфекционных заболеваний. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2013;2:4-13.
2. Шарова ИН, Казакова ЕС, Портенко СА, Красовская ТЮ, Осина НА, Куклев ВЕ, и др. Совершенствование и стандартизация лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;2:46-8.
3. Buchan BW, Ledebor NA. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev. 2014;27(4):783-822. doi: 10.1128/CMR.00003-14.
4. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. Nat Rev Microb. 2013; 11:574-85.
5. Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. Biochim Biophys Acta. 2015;1854(6):528-37. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.10.022

6. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0002843.
7. Spinali S, van Belkum A, Goering RV, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, et al. Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation? *J Clin Microbiol*. 2015;53(3):760-5. doi: 10.1128/JCM.01635-14.
8. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. 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. doi: 10.1128/CMR.00072-12.
9. Балахонов СВ, Афанасьев МВ, Шестопалов МЮ, Остяк АС, Витязева СА, Корзун ВМ, 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.
10. Афанасьев МВ, Остяк АС, Балахонов СВ. Апробация метода масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для идентификации возбудителя чумы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014;8:39-43.
11. Афанасьев МВ, Миронова ЛВ, Басов ЕА, Остяк АС, Куликалова ЕС, Урбанович ЛЯ, и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ в ускоренной идентификации микроорганизмов рода *Vibrio*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014;3:22-9.
12. Khunkheeva ZhYu, Mironova LV, Balakhonov SV, Afanas'ev MV. Using of MALDI-TOF for genetically altered *Vibrio cholerae* eltor variants detection. Abstracts of 15th Medical Biodefense Conference (Munich, Germany, 26-29 April 2016):56.
13. Kim EJ, Lee CH, Nair GB, Kim DW. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol*. 2015;23(8):479-89. doi: 10.1016/j.tim.2015.03.010.
14. spectrometry: do we need guidance for data interpretation? *J Clin Microbiol*. 2015;53(3):760-5. doi: 10.1128/JCM.01635-14.
15. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. 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. doi: 10.1128/CMR.00072-12.
16. Balakhonov SV, Afanas'ev MV, Shestopalov MYu, Ostyak AS, Vityazeva SA, Korzun VM, 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. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2013;1:60-5. (In Russian).
17. Afanasyev MV, Ostiyak AS, Balakhonov SV. The approbation of technique of mass spectrometry with matrix-activated laser desorption/ionization for identification of plague agent. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2014; 8:39-43. (In Russian).
18. Afanasev MV, Mironova LV, Basov EA, Ostyak AS, Kuliakalova ES, Urbanovich LY, et al. MALDI-TOF mass spectrometry in the accelerated identification of microorganisms of the *Vibrio* genus. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2014;3:22-9. (In Russian).
19. Khunkheeva ZhYu, Mironova LV, Balakhonov SV, Afanas'ev MV. Using of MALDI-TOF for genetically altered *Vibrio cholerae* eltor variants detection. Abstracts of 15th Medical Biodefense Conference (Munich, Germany, 26-29 April 2016):56.
20. Kim EJ, Lee CH, Nair GB, Kim DW. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol*. 2015;23(8):479-89. doi: 10.1016/j.tim.2015.03.010

## References

1. Onishchenko GG, Ezhlova EB, Demina YuV, Melnikova AA. On measures to improve epidemiological surveillance in the indication of infectious pathogens. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2013;2:4-13. (In Russian).
2. Sharova IN, Kazakova ES, Portenko SA, Krasovskaya TYu, Osina NA, Kuklev VE, et al. Improvement and Standardization of Laboratory Diagnostics Procedures as Concerns Particularly Dangerous, “Emerging”, and “Reemerging” Infectious Diseases. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2013;2:46-8. (In Russian).
3. Buchan BW, Ledebouer NA. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):783-822. doi: 10.1128/CMR.00003-14.
4. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microb*. 2013;11:574-85.
5. Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1854(6):528-37. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.10.022
6. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0002843.
7. Spinali S, van Belkum A, Goering RV, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, et al. Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass

---

### Информация о соавторах:

Миронова Лилия Валерьевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией холеры ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора  
Адрес: 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78  
Телефон: (3952) 22-0139

Афанасьев Максим Владимирович, кандидат биологических наук, ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора  
Адрес: 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78  
Телефон: (3952) 23-9985

Куликалова Елена Станиславовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела зоонозных инфекций ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора  
Адрес: 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78  
Телефон: (3952) 22-0139

Остяк Александр Сергеевич, научный сотрудник отдела биологического и технологического контроля ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора  
Адрес: 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78  
Телефон: (3952) 22-0132

---

### Information about co-authors:

Liliya V. Mironova, PhD (Med), Head, Plague Research Laboratory, Irkutsk Antiplague Research Institute, Rospotrebnadzor  
Address: 78, ul. Trilissera, Irkutsk, 664047, Russian Federation  
Phone: (3952) 22-0139

Mikhail V. Afanas'ev, PhD (Biol), Irkutsk Antiplague Research Institute, Rospotrebnadzor  
Address: 78, ul. Trilissera, Irkutsk, 664047, Russian Federation  
Phone: (3952) 23-9985

Elena S. Kuliakalova, PhD (Med), Senior Researcher, Zoonotic Infections Dept., Irkutsk Antiplague Research Institute, Rospotrebnadzor  
Address: 78, ul. Trilissera, Irkutsk, 664047, Russian Federation  
Phone: (3952) 22-0139

Alexandr S. Ostyak, Researcher, Biological & Technological Control Dept., Irkutsk Antiplague Research Institute, Rospotrebnadzor  
Address: 78, ul. Trilissera, Irkutsk, 664047, Russian Federation  
Phone: (3952) 22-0132