

Идентификация ботулинического токсина типа А методом масс-спектрометрии в сочетании с иммуномагнитной сепарацией

А.К.Сурин^{1,2}, Н.А.Петухов¹, М.А.Шкуратова¹, А.Е.Хлынцева¹, М.М.Рогозин¹,
Я.О.Романенко¹, В.В.Фирстова^{1,2}

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Пущино, Московская область, Российская Федерация

Ботулинические нейротоксины продуцируются анаэробными бактериями рода *Clostridium* и вызывают стойкий паралич периферических нервных окончаний, который известен как ботулизм. Данное заболевание требует своевременной диагностики и выявления источников заражения для предотвращения вспышек. При этом традиционные методы обнаружения токсина имеют значительные недостатки: полимеразная цепная реакция и микробиологическое исследование не всегда обеспечивают необходимую скорость и точность. В данном исследовании проводилась оценка эффективности метода детекции ботулотоксина типа А в сложных биологических жидкостях с использованием масс-спектрометрического анализа с иммуномагнитной сепарацией. В ходе работы было получено четыре варианта композиционных магнимоиммосорбентов для детекции ботулотоксина типа А. В качестве экспериментальной модели использовали консервированные соленья с добавлением рекомбинантных белков ботулотоксина типа А. Полученные композиционные магнимоиммосорбенты использовали для концентрирования целевого белка из образца для возможности идентификации токсина методом тандемной масс-спектрометрии. Наибольшую результативность демонстрировали композиционные магнимоиммосорбенты, содержащие моноклональные антитела mab_CB-HCA_1-8 к тяжелой цепи ботулотоксина типа А. Эффективность детекции ботулотоксина оценивалась по количеству идентифицированных пептидов в результате масс-спектрометрического анализа. Предложен композиционный магнитный иммосорбент на основе моноклональных антител, позволяющий определять с высокой чувствительностью (до 500 нг/мл) и специфичностью наличие ботулинического нейротоксина в сложных биологических жидкостях.

Ключевые слова: ботулинический нейротоксин, композиционные магнимоиммосорбенты, моноклональные антитела, масс-спектрометрия

Для цитирования: Сурин А.К., Петухов Н.А., Шкуратова М.А., Хлынцева А.Е., Рогозин М.М., Романенко Я.О., Фирстова В.В. Идентификация ботулинического токсина типа А методом масс-спектрометрии в сочетании с иммуномагнитной сепарацией. Бактериология. 2024; 9(4): 82–87. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-82-87

Identification of botulinum toxin type A by mass spectrometry combined with immunomagnetic separation

А.К.Surin^{1,2}, N.A.Petukhov¹, M.A.Shkuratova¹, A.E.Khlyntseva¹, M.M.Rogozin¹, Ya.O.Romanenko¹, V.V.Firstova^{1,2}

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow region, Russian Federation;

²Branch of the Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Botulinum neurotoxins are producing by anaerobic bacteria of the genus *Clostridium* and cause persistent paralysis of peripheral nerve endings, known as botulism. This disease requires timely diagnosis and identification of sources of infection to prevent outbreaks. However, traditional methods of detecting the toxin have significant drawbacks: PCR and microbiological testing do not always provide the necessary speed and accuracy. This study assessed the effectiveness of the method for detecting botulinum toxin type A in complex biological fluids using mass spectrometric analysis with immunomagnetic separation. In the course of the work, four variants of composite magnetic immunosorbents for the detection of botulinum toxin type A were obtained. Canned pickles with the addition of recombinant proteins of botulinum toxin type A were used as an experimental model. The obtained composite magnoimmunossorbents were used to concentrate the target protein from the sample to enable

Для корреспонденции:

Петухов Никита Андреевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-00-03

Статья поступила 01.11.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Nikita A. Petukhov, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-00-03

The article was received 01.11.2024, accepted for publication 25.12.2024

the identification of the toxin by tandem mass spectrometry. The highest efficiency was demonstrated by composite magnoimmunosorbents containing monoclonal antibodies mab_CB-HCA_1-8 to the heavy chain of botulinum toxin type A. The efficiency of botulinum toxin detection was assessed by the number of identified peptides, as a result of mass spectrometric analysis. A composite magnetic immunosorbent based on monoclonal antibodies is proposed, which allows determining the presence of botulinum neurotoxin in complex biological fluids with high sensitivity (up to 500 ng/ml) and specificity.

Key words: botulinum neurotoxin, composite magnetic immunosorbents, monoclonal antibodies, mass spectrometry

For citation: Surin A.K., Petukhov N.A., Shkuratova M.A., Khlyntseva A.E., Rogozin M.M., Romanenko Ya.O., Firstova V.V. Identification of botulinum toxin type A by mass spectrometry combined with immunomagnetic separation. Bacteriology. 2024; 9(4): 82–87. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-82-87

Пищевой ботулизм – это форма интоксикации человека, развивающаяся в результате попадания в организм человека ботулинических нейротоксинов (BoNTs). Источником BoNT является *Clostridium botulinum* – анаэробная грамположительная бактерия. Заболевания человека вызывают BoNTs типов А, В, реже Е и F [1]. В организме человека *C. botulinum* размножаются слабо и не синтезируют токсины, за редким исключением. Ботулотоксин накапливается в пищевых продуктах, инфицированных спорами *C. botulinum*, при их прорастании, если созданы анаэробные условия (например, при консервировании). Летальность от пищевого ботулизма в развитых странах составляет 5–10% [2].

Обнаружение BoNT в биологических образцах и продуктах питания имеет решающее значение для ранней диагностики ботулизма и своевременного эффективного лечения заболевания. Кроме того, своевременное выявление источника заражения играет важную роль для предотвращения вспышки ботулизма [3].

Золотым стандартом для обнаружения и идентификации BoNTs является биологический анализ токсичности образца и нейтрализации его сыворотками против ботулинических нейротоксинов разных типов на модели мышей. Однако этот метод имеет несколько недостатков, включая трудоемкость, неэффективность затрат, использование животных и длительность исследования (>4 дней).

Дополнительными методами идентификации наличия и типа токсина в биологических матрицах являются методы иммуоферментного анализа (ИФА) и масс-спектрометрии (МС). Метод ИФА является наиболее чувствительным на сегодняшний момент. Однако при высокой чувствительности этого метода его точность может варьировать от 75 до 95%, что определяется свойствами моноклонального антитела (МКА), сложностью состава биологического образца, а также особенностями подготовки образца для анализа. Метод МС, являясь менее чувствительным по сравнению с ИФА, обладает существенно большей степенью достоверности, которая варьирует от 90 до 100%. Кроме того, метод МС позволяет работать со сложными смесями, что делает его идеальным инструментом для обнаружения и характеристики пищевых токсинов. Предварительное концентрирование токсина с использованием магноиммуносорбентов позволяет обнаруживать BoNT в образцах методом МС при низких концентрациях (нг/мл).

Цель исследования – идентифицировать ботулотоксин типа А в сложной биологической жидкости методом масс-спектрометрии в сочетании с иммуномагнитной сепарацией.

Материалы и методы

Приготовление композиционных магноиммуносорбентов

В работе использовали магнитные сорбенты, приготовленные из оксида железа. Данные магносорбенты были получены из ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт».

Для приготовления композиционных магноиммуносорбентов (КМИС), необходимых для детекции BoNT, были выбраны МКА mab_CB-HCA_1-8 и mab_CB-HCA_2-11 против тяжелой цепи (HC) BoNT А, а также mab_CB-LCA_1-9 против легкой цепи (LC) BoNT А. Указанные МКА и рекомбинантные белки были получены в лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора [4–6].

Для получения КМИС во флаконы пенициллиновые ФО-1-10-НС-1 насыпали навеску магносорбентов. Связывание МКА с магнитными частицами проводили двумя способами: физической сорбцией и ковалентной сшивкой. За основу использовали методику, описанную в патенте, с изменениями и дополнениями [7].

Приготовление КМИС с физической сорбцией. Для получения аффинных свойств КМИС первоначально проводили активирование: на каждые 0,1 г магносорбентов вносили по 1 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) («Эко-Сервис», Россия), pH 7,2, и 0,05 мл поверхностно активного вещества (ПАВ) – вторичного алкилсульфата натрия, инкубировали 30 мин при температуре 37°C. Далее вносили МКА в различных концентрациях (табл. 1), инкубировали 2 ч при температуре 24°C, трижды отмывали в ФСБ от несвязавшихся МКА и использовали в работе.

Получение КМИС с ковалентной сшивкой. Для получения аффинных свойств КМИС первоначально проводили активирование: на каждые 0,1 г МС вносили по 3 мл 0,2%-го рас-

Таблица 1. Моноклональные антитела, используемые для приготовления КМИС

Table 1. Monoclonal antibodies used for the preparation of CMIS

№ п/п	МКА / MCA	Вносимый объем, мл / Volume introduced, ml	Концентрация белка, мг/мл / Protein concentration, mg/ml	Общая масса белка, мг / Total protein mass, mg
1	mab_CB-LCA_1-9 против rLC BoNT А	0,5	1,6	0,8
2	mab_CB-HCA_2-11 против rHC BoNT А	1	2,1	2,1
3	mab_CBHCA_1-8 против rHC BoNT А	1	2,5	2,5

творения натрия перйодата (Acros Organics, Бельгия) на ФСБ pH 7,2, инкубировали 30 мин при температуре 37°C. Далее добавляли МКА (согласно табл. 1), инкубировали 2 ч при температуре 24°C, трижды отмывали ФСБ от несвязавшихся белков и использовали в работе.

Таким образом были приготовлены следующие композиционные магнитоиммосорбенты для детекции ботулотоксина:

- традиционные с физической сорбцией, несущие мышинное МКА mab_CB-HCA_2-11 против HC/A BoNT;
- традиционные с ковалентной сшивкой, несущие мышинное МКА mab_CB-HCA_2-11 против HC/A BoNT;
- традиционные с физической сорбцией, несущие мышинное МКА mab_CB-HCA_1-8 против HC/A BoNT;
- традиционные с физической сорбцией, несущие мышинные МКА mab_CB-LCA_1-9 против LC/A BoNT.

Приготовление сложной биологической смеси

В качестве модели для определения концентрации BoNT использовали 50 мл консервированных солений, к которым добавляли 25 мкг рекомбинантного ботулотоксина типа А (rBoNT A). В анализируемом образце pH доводили до 7,5 гидроксидом калия (KOH). При увеличении pH образовывался осадок. Для удаления осадка и крупных частиц образец центрифугировали при 10 000 g 10 мин и фильтровали через мембрану с размером пор 0,45 µm (Millipore, Ирландия).

Элюция целевых белков с поверхности КМИС

Для элюции тяжелой и легкой цепей ботулинического нейротоксина типа А с КМИС использовали методику, описанную в патенте, с изменениями и дополнениями [7]. Десорбцию белка проводили 0,15%-м раствором KOH (ГОСТ 9285-78), который считается наиболее активным элюентом, обеспечивающим эффективную десорбцию токсина с магнитной иммобилизованной матрицы.

Постановку эксперимента осуществляли в микропробирках (1,5 мл) типа Эппендорф (Eppendorf, Австрия) с использованием магнитного сепаратора MagnaRacK (Invitrogen, США). К 100 мкл КМИС вносили по 0,1 мл белковых токсинов с концентрацией 500 мкг/мл. В контрольный образец вносили бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США), инкубировали 60 мин при температуре 37°C и промывали 3 раза от несвязавшихся лигандов ФСБ с твин-20 (Sigma-Aldrich, США). Далее в осадок (0,025 г) вносили 100 мкл 0,15%-го раствора KOH на 20–30 мин. Супернатант, содержащий целевой белок, переносили в чистую пробирку и добавляли к нему 0,016 мл 0,1 М соляной кислоты (HCl, качество реактива – чистый для анализа, ГОСТ 3118 77) для нейтрализации щелочи.

Подготовка образцов к проведению масс-спектрометрического анализа

Для выделения рекомбинантного белка применяли метод электрофоретического разделения в полиакриламидном геле по Лэммли. Для визуализации результатов электрофореза использовали окрашивание белков в гелях красителем кумасси синим (Coomassie Brilliant blue R-250). Полученные белки вырезали из геля и помещали в пробирки типа Эппендорф (1,5 мл). Для удаления додецилсульфата натрия использовали метанол (40%) и уксусную кислоту (5%). Для отмывки от красителя кумасси синего добавляли 50% ацетонитрила в 50 mM NH₄HCO₃ и инкубировали при температуре 56°C в течение 30 мин, повторяя этап до полной отмывки.

Восстановление и алкилирование дисульфидных связей проводили с использованием 5 mM дихлор-дифенил-трихлорэтана (в течение 30 мин при температуре 25°C) и 15 mM йодацетамида (в течение 30 мин при температуре 25°C). Затем к гелю добавляли ацетонитрил (100%), после удаления которого происходило высушивание геля на вакуумном концентраторе miVac (Genevac, Великобритания). К полученным образцам добавляли раствор трипсина (0,01 мг/мл) в буфере 50 mM NH₄HCO₃ и инкубировали 20 ч при температуре 37°C, после чего реакция действия протеаз останавливалась 0,1% TFA (Trifluoroacetic acid) в 80%-м ацетонитриле в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации гель полностью высушивался в вакуумном концентраторе. Затем образцы растворяли в 4%-м ацетонитриле и 0,1% TFA. Для удаления следов красителя, примеси солей и крупных пептидов проводилась очистка образцов на зип-типах. (Зип-тип – это наконечник, набитый стационарной фазой C18, которая выполняет роль фильтра.) Фаза C18 в наконечнике промывалась ацетонитрилом (сначала 90%-м, затем 4%-м) с добавлением 0,1% TFA. На подготовленный зип-тип наносился образец, который отмывали с фазы ацетонитрилом (сначала 4%-м, затем 90%-м) с добавлением 0,1% TFA. Полученный образец высушивали на вакуумном концентраторе. Далее хранение белков осуществлялось при температуре 4°C. Перед MS-анализом образец растворяли в 4%-м ацетонитриле с 0,1% TFA.

Масс-спектрометрический анализ

МС-анализ проводили на хромато-масс-спектрометре высокого разрешения. Пептиды, полученные при гидролизе исследуемого белка, предварительно разделяли с помощью нанопотокового хроматографа Easy nLC 1000 (Thermo Scientific, США), МС-анализ пептидов проводили на масс-спектрометре Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Германия). Пептиды разделяли на капиллярной колонке диаметром 75 мкм и длиной 200 мм, набитой в лабораторных условиях частицами 3,6 мкм с порами 90 Å с привитой фазой C18. Образец элюировали в градиенте ацетонитрила в воде в присутствии 0,1% TFA. Изменение концентрации ацетонитрила с 4 до 50% проводили линейно в течении 120 мин. Смываемые с колонки пептиды ионизировали методом электрораспыления. Панорамные масс-спектры снимали в диапазоне от 300 до 1600 m/z. После каждого панорамного спектра снимали 10 спектров фрагментации для наиболее интенсивных ионов. Фрагментацию ионов проводили методом активации соударениями с молекулами инертного газа ДАС (диссоциация, активированная соударениями) в высокоэнергетической ячейке соударений.

Данные МС-анализа обрабатывали с помощью коммерческих программ PeaksStudio 7.5 и Xcalibur 2.2.

Результаты исследования и их обсуждение

Для магнитной сепарации ботулотоксина из анализируемых образцов были выбраны три МКА, специфичные к HC (mab_CB-HCA_2-11, mab_CB-HCA_1-8) и LC (mab_CB-LCA_1-9 МКА) BoNT типа А, полученных ранее в лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ.

С использованием mab_CB-HCA_2-11, mab_CB-HCA_1-8 и mab_CB-LCA_1-9 МКА были приготовлены традиционные

Таблица 2. КМИС, подготовленные для магнитной сепарации ботулотоксина
 Table 2. CMIS prepared for magnetic separation of botulinum toxin

№ п/п	Тип магносорбентов / Magnosorbent type	Тип связывания / Type of binding	МКА / MCA	Антиген / Antigen
1	Традиционные / Traditional	Ковалентная сшивка / Covalent crosslinking	mab_CB-HCA_2-11	HC BoNT тип А
2	Традиционные / Traditional	Физическая сорбция / Physical sorption	mab_CB-HCA_2-11	HC BoNT тип А
3	Традиционные / Traditional	Физическая сорбция / Physical sorption	mab_CB-HCA_1-8	HC BoNT тип А
4	Традиционные / Traditional	Физическая сорбция / Physical sorption	mab_CB-LCA_1-9	LC BoNT тип А

КМИС двумя методами: с физической сорбцией и с ковалентной сшивкой. В результате были получены четыре варианта КМИС для магнитной сепарации BoNT типа А (табл. 2).

Ковалентное связывание МКА с нерастворимым магнитным носителем осуществлялось через альдегидную группу с образованием азометиновой связи, что не оказывало влияния на специфическую активность антител. При физической сшивке использовали ПАВ для предотвращения агрегирования частиц и образования пространственных структур, сохраняющих специфическую активность МКА.

Сохранение специфической активности МКА, связанных с магносорбентом, подтверждали в ИФА (данные не приведены). Далее проводили магнитную сепарацию BoNT из консервированных продуктов с последующим МС-анализом (рис. 1). Для повышения качества выявления BoNT использовали метод тандемной МС, который основан на получении информации как о точной массе пептида, так и взаимном расположении аминокислот в пептиде. Об эффективности использования магнитных частиц с иммобилизованными МКА для детекции HC и LC BoNT судили по числу пептидов, идентифицированных в МС-анализе (табл. 3).

На основании данных МС-анализа было установлено, что наиболее эффективно концентрируют ботулотоксин типа А

Таблица 3. Эффективность использования магнитных частиц с иммобилизованными моноклональными антителами против HC и LC BoNT типа А для детекции ботулотоксина
 Table 3. Efficiency of using magnetic particles with immobilized monoclonal antibodies against HC and LC BoNT type A for detecting botulinum toxin

Тип AMP / AMP type	Концентрация ботулинического токсина* / Botulinum toxin concentration		
	25 мкг	50 мкг	100 мкг
2B11 к HC BoNT тип А (физическая сшивка / physical stitching)	–	НА	–
2B11 к HC BoNT тип А (ковалентная сшивка / covalent crosslinking)	–	НА	2
1F8 к HC BoNT тип А (физическая сшивка / physical stitching)	2	8	11
1F9/ к LC BoNT тип А (физическая сшивка / physical stitching)	М	19	М

*Цифрами указано число пептидов, идентифицированных в масс-спектрометрическом анализе трипсиновых фрагментов продуктов смыва с антител (AMP). / *The numbers indicate the number of peptides identified in the mass spectrometric analysis of trypsin fragments of antibody wash products (AMP).

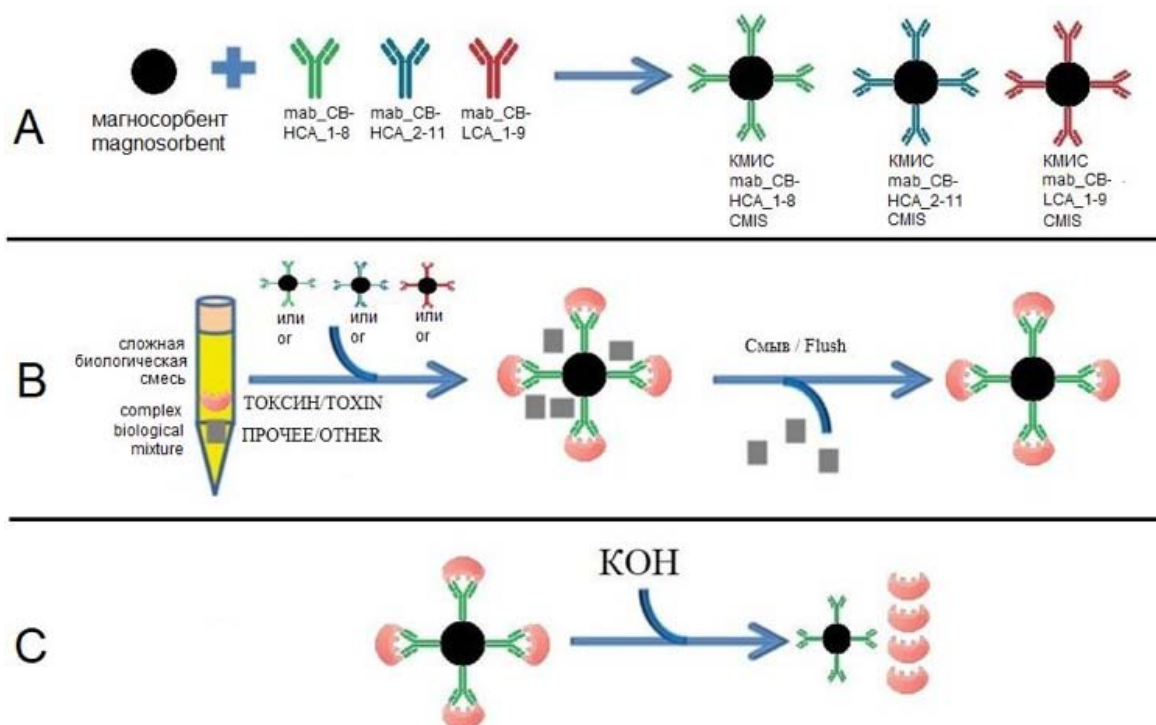


Рис. 1. Этапы магнитной сепарации ботулотоксина типа А из анализируемых образцов. А – приготовление КМИС, В – инкубация образца с КМИС, С – элюция ботулотоксина с КМИС.

Fig. 1. Stages of magnetic separation of botulinum toxin type A from analyzed samples. A – preparation of CMIS, B – incubation of sample with CMIS, C – elution of botulinum toxin from CMIS.

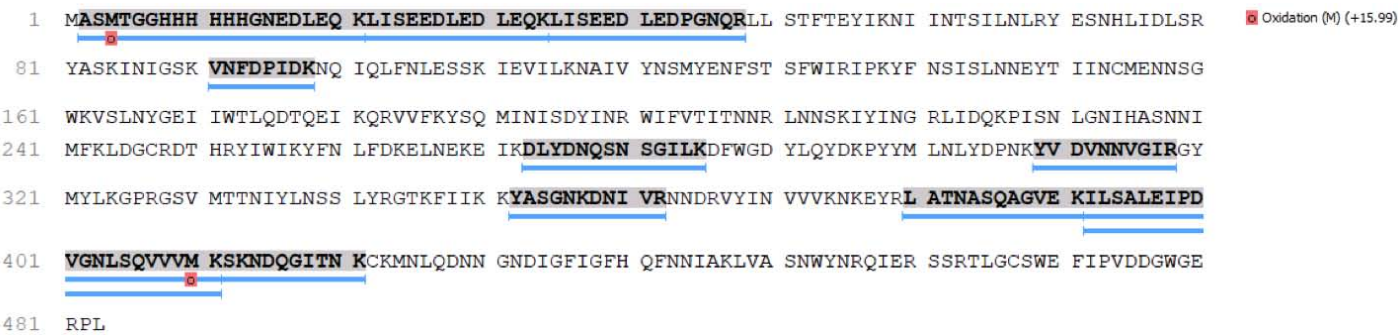


Рис. 2. Результат обработки программой Peaks Studio 7.5 масс-спектрометрических данных. Наложения идентифицированных пептидов на аминокислотную последовательность ботулотоксина типа А – темным фоном выделены участки аминокислотной последовательности, определенные методом масс-спектрометрии, синим цветом подчеркнуты последовательности, соответствующие найденным пептидам.
Fig. 2. Result of mass spectrometric data processing by Peaks Studio 7.5. Overlays of identified peptides on the amino acid sequence of botulinum toxin type A – dark background indicates sections of the amino acid sequence determined by mass spectrometry, sequences corresponding to the identified peptides are underlined in blue.

из образца сложной биологической смеси традиционные КМИС с физической сшивкой, несущие МКА mab_CB-HCA_1-8 к HC BoNT типа А. Идентифицированные пептиды аминокислотной последовательности ботулотоксина типа А представлены на рис. 2.

В результате МС-анализа были выявлены чаще всего детектируемые пептиды ботулинического токсина (HC BoNT типа А) (табл. 4).

Диагностика ботулизма основывается в первую очередь на клинической картине, за которой следуют подтверждающие лабораторные анализы. Традиционными лабораторными процедурами являются полимеразная цепная реакция (ПЦР), микробиологическое исследование для обнаружения бактерий и биопроба на мышах для обнаружения токсина. Тестирование ПЦР является быстрым, но для выполнения двух других процедур требуется несколько дней. Однако ПЦР обнаруживает гены *C. botulinum*, а не его токсин, и поэтому не является достаточным для подтверждения клинического диагноза ботулизма. При отсутствии быстрого, чув-

ствительного лабораторного теста для обнаружения ботулинического токсина врач должен принять решение об эмпирическом лечении антитоксином без поддержки лабораторных результатов. Наблюдаемые паралитические симптомы не являются специфичными для ботулизма, но также могут быть связаны с рядом других заболеваний. Неправильная диагностика ботулизма может привести к длительной госпитализации и зависимости от поддерживающей вентиляции легких, а при ошибочном подозрении на ботулизм пациентам могут ввести ненужный антитоксин, что несет риск анафилаксии и сывороточной болезни.

Сконструированный нами КМИС на основе mab_CB-HCA_1-8 позволил сконцентрировать целевой белок из 50 мл анализируемого образца. В данном исследовании чувствительность МС-анализа составила 500 нг/мл.

Закключение

Таким образом, в ходе работы нами был получен композиционный магноиммуносорбент с физической сшивкой с МКА СВ-HCA_1-8, специфичный к ботулотоксину типа А, который позволил увеличить специфичность и чувствительность МС-анализа более чем на порядок.

Информация о финансировании

Работа выполнена по НИОКР 1.1.14 в рамках государственного задания.

Funding information

The work was carried out within the framework of R&D 1.1.14. within the framework of the state assignment.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, et al. Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. Toxins (Basel). 2017 Jan 18;9(1):38. DOI: 10.3390/toxins9010038

Таблица 4. Пептиды ботулинического токсина, идентифицированные масс-спектрометрическим анализом Table 4. Botulinum toxin peptides identified by mass spectrometric analysis				
№	Аминокислотная последовательность идентифицированного пептида / Amino acid sequence of the identified peptide	Масса пептида / Peptide mass	m/z	z
1	K.ILSALEIPDVGNLSQVVVM(+15.99)K.S	2140,1814	714,4001	3
2	K.LISEEDLEDPGNQRL	1613,7533	807,8822	2
3	.DLYDNQSN SGILK.D	1465,7048	733,8578	2
4	K.LISEEDLEDLEQK.L	1559,7566	780,8821	2
5	R.LATNASQAGVEK.I	1187,6146	594,8131	2
6	K.YASGNKDNI VR.N	1235,6259	618,8190	2
7	K.ILSALEIPDVGNLSQVVVMK.S	2124,1863	1063,0974	2
8	K.YDVNVNGIR.G	1147,5985	574,8056	2
9	K.VNFDPIDK.N	946,4760	474,2453	2
10	M.ASM(+15.99) TGGHHHHHHHGNEDLEQK.L	2273,9734	569,4994	4
11	K.SKNDQGITNK.C	1103,5571	552,7855	2

2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Botulism Annual Summary, 2018. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2021.
3. Никифоров ВВ, Томилин ЮН, Чернобровкина ТЯ, Янковская ЯД, Бузова СВ. Трудности ранней диагностики и лечения ботулизма. Архив внутренней медицины. 2019;9(4):253-259. DOI: 10.20514/2226-6704-2019-9-4-253-259
4. Рябко АК, Козырь АВ, Колесников АВ, Хлынцева АЕ, Жарникова ИВ, Шемякин ИГ. Стратегии повышения чувствительности детекции аналитов в иммуно-ПЦР, изученные на примере выявления нейротоксина ботулизма типа А. Прикладная биохимия и микробиология. 2016;52(1):128. DOI: 10.7868/S0555109916010116
5. Zeninskaya NA, Ryabko AK, Marin MA, Kombarova TI, Shkuratova MA, Rogozin MM, et al. Selection of Candidate Monoclonal Antibodies for Therapy of Botulinum Toxin Type A Intoxications. Toxins (Basel). 2024 Jun 21;16(7):284. DOI: 10.3390/toxins16070284
6. Зенинская НА, Марьян МА, Рябко АК, Карцева АС, Силкина МВ, Комбарова ТИ, и др. Получение гибридом, синтезирующих мышиные моноклональные антитела против легкой цепи ботулотоксина типа А. Бактериология. 2022;7(3):33.
7. Geogdjayan AS, Zharnikova IV, Kurcheva SA, Koteneva EA, Zharnikova TV, Gnusareva OA, et al. Patent for invention No 2756202 from 28.09.2021. Bul. No 28. Method of obtaining magnetic immunosorbents for selective concentration of *F. tularensis* from environmental objects with subsequent detection by MALDI-TOF MS/ MS/. *Tularensis* from environmental objects with subsequent detection by MALDI-TOF MS method.

References

1. Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, et al. Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. Toxins (Basel). 2017 Jan 18;9(1):38. DOI: 10.3390/toxins9010038
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Botulism Annual Summary, 2018. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2021.
3. Nikiforov VV, Tomilin YuN, Chernobrovkina TYa, Yankovskaya YaD, Burova SV. The difficulties of early diagnosis and treatment of botulism. The Russian Archives of Internal Medicine. 2019;9(4):253-259. DOI: 10.20514/2226-6704-2019-9-4-253-259 (In Russian).
4. Ryabko AK, Kozyr' AV, Kolesnikov AV, Khlyntseva AE, Shemyakin IG, Zharnikova IV. Strategies for upgrading analyte detection in immuno-PCR studied on identification of type A botulinum neurotoxin. Applied Biochemistry and Microbiology. 2016;52(1):128. DOI: 10.7868/S0555109916010116 (In Russian).
5. Zeninskaya NA, Ryabko AK, Marin MA, Kombarova TI, Shkuratova MA, Rogozin MM, et al. Selection of Candidate Monoclonal Antibodies for Therapy of Botulinum Toxin Type A Intoxications. Toxins (Basel). 2024 Jun 21;16(7):284. DOI: 10.3390/toxins16070284
6. Zeninskaya NA, Maryin MA, Ryabko AK, Kartseva AS, Silkina MV, Kombarova TI, et al. Obtaining hybridomas that synthesise mouse monoclonal antibodies against the light chain of botulinum toxin type A. Bacteriology. 2022;7(3):33. (In Russian).

Информация о соавторах:

Сурин Алексей Константинович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний Филиала Института биоорганической химии РАН

Шкуратова Мария Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Рогозин Метхун Мадисонович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Хлынцева Анна Евгеньевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Романенко Яна Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Alexey K. Surin, PhD in physics and mathematics, Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology; Senior Researcher, Laboratory of Biological Testing, Branch of the Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences

Maria A. Shkuratova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Methun M. Rogozin, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Anna E. Khlyntseva, PhD in Biological Sciences, Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Victoria V. Firstova, PhD, DSc in Biological Sciences, Chief Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Yana O. Romanenko, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Federal State Budgetary Scientific Institution "State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology" of Rospotrebnadzor