

# Времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией как современный метод анализа микроорганизмов

Д.А.Ковалев, Д.В.Ульшина, И.В.Кузнецова

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

В последнее время для индикации, идентификации и типирования микроорганизмов успешно применяется времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) – один из интенсивно развивающихся современных методов анализа органических соединений, в том числе белков. Возможность прямого исследования нелетучих высокомолекулярных соединений широкого диапазона значений масс определила успешное использование метода для изучения белковых экстрактов бактериальных клеток. В обзоре представлены примеры использования MALDI-TOF MS при анализе микроорганизмов и интерпретации полученных данных, определены основные преимущества и недостатки методики.

**Ключевые слова:** MALDI-TOF MS, белковое профилирование, индикация, идентификация

**Для цитирования:** Ковалев Д.А., Ульшина Д.В., Кузнецова И.В. Времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией как современный метод анализа микроорганизмов. Бактериология. 2018; 3(1): 13–17. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-13-17

## Time-of-flight mass spectrometry with matrix laser desorption/ionization as a modern method of analysis of microorganisms

D.A.Kovalev, D.V.Ulshina, I.V.Kuznetsova

Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Stavropol, Russian Federation

Recently, time-of-flight mass spectrometry with matrix laser desorption/ionization (MALDI-TOF MS), one of the most sophisticated technologies of modern organic analysis, including proteins, has been successfully used for the indication, identification and typing of microorganisms. The possibility of direct investigation of non-volatile high-molecular compounds. The method successfully used for studying protein extracts of bacterial cells because of possibility of direct investigation of non-volatile high-molecular compounds of a wide range of mass values. The review presents examples of the use of MALDI-TOF MS in the analysis of microorganisms and interpretations, the main advantages and disadvantages of the methodology.

**Keywords:** MALDI-TOF MS, protein profiling, indication, identification

**For citation:** Kovalev D.A., Ulshina D.V., Kuznetsova I.V. Time-of-flight mass spectrometry with matrix laser desorption/ionization as a modern method of analysis of microorganisms. Bacteriology. 2018; 3(1): 13–17. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-13-17

**Н**естабильная обстановка по особо опасным, «возвращающимся» и «новым» инфекциям, реальная угроза биотерроризма актуализируют вопрос внедрения новых методов индикации, идентификации и типирования микроорганизмов I–II групп патогенности и диагностики вызываемых ими болезней [1].

Классические методы лабораторной диагностики патогенных микроорганизмов, основанные на культивировании, изучении особенностей метаболизма и антигенного строения, различной чувствительности к бактериофагам и антибиотикам, отличаются ресурсоемкостью. Данные методы, основанные на изучении фенотипических свойств, имеют некото-

### Для корреспонденции:

Ковалев Дмитрий Анатольевич, заведующий лабораторией биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15

Телефон: (8652) 26-0312

E-mail: kovalev\_da.stv@list.ru

Статья поступила 27.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

### For correspondence:

Dmitry A. Kovalev, researcher, laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol', 355035, Russian Federation

Phone: (8652) 26-0312

E-mail: kovalev\_da.stv@list.ru

The article was received 27.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

рые недостатки, связанные с относительной однородностью фенотипических свойств штаммов, что определяет трудности в межвидовой дифференциации микроорганизмов [2–4].

Использование молекулярно-генетических методов исследования способствовало расширению возможностей диагностики инфекционных заболеваний, позволяя осуществлять прямое выявление фрагментов генома возбудителя в исследуемом материале.

Совершенствование лабораторной диагностики инфекционных заболеваний предусматривает, в том числе, разработку новых методов исследования, позволяющих не только выявить, но и охарактеризовать возбудителя инфекционного заболевания.

В настоящее время внедрение времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) в систему индикации, идентификации и типирования патогенных микроорганизмов является актуальным направлением, но требует разработки стандартизированных подходов к пробоподготовке, формированию и оценке масс-спектров, интерпретации полученных результатов, а также подготовки нормативно-методических документов, регламентирующих проведение всех этапов анализа.

MALDI-TOF MS – один из наиболее интенсивно развивающихся современных методов анализа органических соединений, в том числе белков. Возможность прямого исследования молекул массой 1–100 kDa определила успешное применение MALDI-TOF MS для изучения эндогенных и экзогенных низкомолекулярных метаболитов с  $m/z$  (отношение массы иона к заряду) менее 1000 Da. Этой технологией успешно пользовались в течение нескольких десятилетий в химии, в 1975 г. Ангальт и Фенселау [5] впервые предположили, что метод можно применить для исследования бактериальных культур. В подтверждение этого учеными были получены уникальные масс-спектры бактериальных экстрактов для бактерий разных родов. В 1980-х годах развитие технологии десорбции/ионизации, в том числе плазменной десорбции (ПД), лазерной десорбции (ЛД) и бомбардировки быстрыми атомами (ББА), способствовало широкому использованию белкового профилирования с возможностью генерации молекулярных ионов биомаркеров микроорганизмов [6]. Произошедшая в конце 1980-х гг. эволюция видов ионизации, завершившаяся появлением методов MALDI и электрораспыления (ESI), позволила проводить анализ крупных биомолекул, в частности интактных белков [7].

Дальнейшее использование технологии привело к появлению дополнительного этапа на стадии пробоподготовки – предварительной очистки и экстракции бактериальных клеток, предложенного и апробированного группой авторов при исследовании бактерий методом MALDI-TOF MS [8]. Но в 1996 г. Холланд с коллегами впервые опубликовали сообщение о получении спектральных характеристик интактных бактериальных клеток без предварительной обработки перед анализом [9]. Значительно позднее этот подход был использован несколькими исследовательскими группами для идентификации бактерий на уровне рода и вида [10].

Последующее успешное использование метода MALDI-TOF MS для быстрой идентификации микроорганизмов стало возможным благодаря «щадящему» режиму перевода молекул нелетучего высокомолекулярного соединения,

нанесенного на мишень, в газовую фазу, преимущественно в виде однозарядных ионов совместно с вспомогательным низкомолекулярным соединением (матрицей) – слабой органической кислотой, имеющей сильное оптическое поглощение в диапазоне длины волны используемого лазера [11].

В качестве матрицы широко используются феруловая (FA) и  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная (CHCA) кислоты, которые наиболее эффективны при обнаружении белковых биомаркеров, 2,5-дигидроксibenзойная кислота (DHB) – при исследовании гликопептидов и гликопротеинов, кроме того, описано применение синапиновой (CA) и 2,4-гидроксифенил бензойной кислот [12].

Известно, что присутствие широкого набора сигналов в спектрах бактериальных экстрактов обусловлено наличием рибосомальных белков в исследуемом образце, которые могут быть использованы для идентификации микроорганизмов. Поскольку указанные белки являются высококонсервативными, они могут быть использованы в качестве маркеров для индикации микробов. В свою очередь, обработка масс-спектров и обнаружение белковых маркеров являются ключевыми этапами статистического анализа для интерпретации полученных MS данных.

В настоящее время существуют как минимум три коммерческие платформы для идентификации бактерий и грибов методом MALDI-TOF MS. В двух из них – BioTyper (Bruker Daltonics, Германия) и SARAMIS Vitek-MS (bioMérieux, Франция) идентификация осуществляется путем компьютерного сравнения полученного масс-спектра с архивированными в базах данных супер-спектрами или основными спектрами, генерированными при повторной масс-спектрометрии набора штаммов или типового штамма определенного вида. Третья платформа – Andromas (Andromas SAS, Франция), в базе данных которой заложены множественные видоспецифичные спектральные профили каждого микроорганизма. Указанные приборные линии содержат собственные идентификационные базы, включающие референсные масс-спектрометрические профили большого количества микроорганизмов. Все три платформы являются открытыми, пользователь может пополнять базу собственными данными [13], что важно при исследовании возбудителей природно-очаговых (ПОИ) и особо опасных инфекций (ООИ), спектры которых в коммерческих базах данных отсутствуют. По этой причине в результате видовой идентификации в среде платформы Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) с использованием программы FlexAnalysis 3.0 и референс-библиотеки 3.0 возбудитель сибирской язвы в вегетативной форме определяется как «вероятный *Bacillus cereus*» [14].

Таким образом, опыт успешного применения масс-спектрометрического анализа в исследовании бактериальных экстрактов способствовал интеграции метода MALDI-TOF MS в систему традиционных схем индикации и идентификации микроорганизмов в ряде зарубежных стран [15–17]. Описано прямое определение методом MALDI-TOF MS наличия спор сибиреязвенного микроба в подозрительных порошках, содержащих ржаную и пшеничную муку, сухое молоко [18]. В российских литературных источниках показаны примеры успешного применения метода MALDI-TOF MS для индикации, идентификации возбудителей чумы [18, 19], сибирской язвы [20], бруцеллеза [21], холеры и других мик-

роорганизмов рода *Vibrio*, туляремии [22], лептоспироза [23], сапа и мелиоидоза [24].

За последнее десятилетие наблюдается расширение области применения метода MALDI-TOF MS, включающей не только протеомный анализ для картирования белков в научных целях, но и клиническую лабораторную диагностику на основании выявления на белковых профилях микробной клетки групп специфических фрагментов [25]. Одно из наиболее востребованных направлений – изучение возможности применения MALDI-TOF MS для выявления возбудителей инфекционных болезней в клинических образцах без этапа выделения чистой культуры на стадии пробоподготовки [26]. Однако отсутствие регламентированных методик обеззараживания и подготовки исследуемого нативного материала, а также доступного программного обеспечения для анализа образцов является основной причиной относительно низкой воспроизводимости результатов масс-спектрометрии [27]. В результате серии экспериментальных MALDI-TOF MS исследований клинического материала, подозрительного на присутствие возбудителя инфекции, были получены ложноотрицательные результаты, что может быть связано с низкой концентрацией возбудителя в материале [28]. Сложность интерпретации полученных данных при анализе клинических образцов обусловлена существенной вариабельностью качественного и количественного состава белковых профилей, полученных от различных индивидуумов. В качестве эффективного решения указанной проблемы исследователями предложены различные способы предварительной подготовки проб: концентрирование, фракционирование, удаление мажорных фракций белков, селективное удаление небелковых примесей и др. [29].

Как и все методы лабораторной диагностики, MALDI-TOF MS обладает рядом преимуществ и недостатков. Безусловно, относительно низкая стоимость пробоподготовки, высокая производительность и скорость анализа позволят в дальнейшем определить место универсальной платформы MALDI-TOF MS в системе лабораторных исследований [30]. К основным ограничениям применения современной MALDI-TOF масс-спектрометрии можно отнести отсутствие в доступных коммерческих базах данных информации о штаммах возбудителей ПОИ и ООИ, необходимость работы с чистыми культурами возбудителя в экспоненциальной фазе роста колонии, влияние условий и времени культивирования микроорганизма, недостаточную точность межвидовой дифференциации близкородственных микроорганизмов [31]. Весомым недостатком является невозможность полноценной идентификации возбудителей, присутствующих в нативном материале и смешанных культурах, что может быть вызвано не принципиальным ограничением самого метода, а несовершенством алгоритма интерпретации полученных результатов. В настоящее время существуют различные алгоритмы анализа данных [32–34]: как общедоступные, например, статистическое программное обеспечение R [<https://cran.r-project.org/>], Mass-Up [<http://sing.ei.uvigo.es>], библиотеки Java [<https://java.com>], так и лицензированные – пакеты Matlab [<https://matlab.ru>], обладающие рядом преимуществ и недостатков.

Учитывая вышесказанное, разработка и внедрение комплексных схем индикации и идентификации патогенных микроорганизмов, основанных на оценке степени сходства

масс-спектра образца с референсными спектрами из базы данных (значения score), и одновременное выявление родо-, видо- и штаммоспецифических биомаркеров конкретного патогена, позволят значительно расширить возможности практического использования технологии MALDI-TOF MS как в экспериментальных, так и в диагностических целях.

Для полноценного использования метода необходимо особое внимание уделить не только созданию информативных электронных баз данных, но и разработке соответствующего программного обеспечения (ПО) – общедоступных универсальных программ с графическим интерфейсом, удобных для пользователя и не требующих навыков программирования [35]. Разработка единого универсального ПО позволит обеспечить поиск и выявление аналитически значимых сигналов (биомаркеров), возможность использования различных алгоритмов кластеризации объектов анализа, классификацию большого массива данных с построением трехмерной визуализации.

В настоящее время перспективным направлением для поиска биомаркеров, проведения классификации в автоматическом режиме, построения кластерных диаграмм являются статистические подходы в сочетании с методами машинного обучения [36].

## Литература

1. Куличенко АН, Кутырев ВВ, Таран АВ. Проблемные вопросы развития молекулярной диагностики опасных инфекций. VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2010». Т. 1, с. 397–400.
2. Dixon P, Davies P, Hollingworth W, Stoddart M, MacGowan A. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 May;34(5):863–76. DOI: 10.1007/s10096-015-2322-0
3. Kazemi S, Borzoueisileh S, Ebrahimpour S. Evaluation of Brucellosis in Patients and Diagnostic Tests. *Online J Anim Feed Res*. 2015;4(3):60–6.
4. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clin Chem*. 2015 Jan;61(1):100–11. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221770
5. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem*. 1975;47:219–25.
6. Heller DN, Cotter RJ, Fenselau C, Uy OM. Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Chem*. 1987 Dec 1;59(23):2806–9.
7. Tanaka K, Fenn JB. (2002) Nobel Laureates in chemistry. Available at: <http://www.nobelprize.org> (accessed 30.03.2018)
8. Cain TC, Lubman DM, Webber WJ. Differentiation of bacteria using protein profiles from MALDI-TOF/MS. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1994;8:1026–30.
9. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay JO. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1996;10(10):1227–32.
10. Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Aug;15(8):796–802. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02788.x
11. Wilkins CL, Lay JO. Identification of microorganisms by mass-spectrometry. Wiley-Blackwell; 2006, 376 p.
12. Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass

- spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol.* 2010;71:149-84. doi: 10.1016/S0065-2164(10)71006-6
13. Clark A, Kaleta E, 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 Jul;26(3):547-603. DOI: 10.1128/CMR.00072-12
  14. Blaschitz M, Meidlinger L, Sagel U, Wewalka G, Allerberger F, Indra A. Detection of highly pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Vienna, Austria, 10 – 13 April 2010. – Abstract number: P1773.
  15. Lasch P, Wahab T, Weil S, Pályi B, Tomaso H, Zange S, et al. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Results of an interlaboratory ring trial. *J Clin Microbiol.* 2015 Aug;53(8):2632-40. DOI: 10.1128/JCM.00813-15
  16. Sandalakis V, Goniotakis I, Vranakis I, Chochlakis D, Psaroulaki A. Use of MALDI-TOF mass spectrometry in the battle against bacterial infectious diseases: recent achievements and future perspectives. *Expert Rev Proteomics.* 2017 Mar;14(3):253-267. DOI: 10.1080/14789450.2017.1282825.
  17. Sokhna C, Gaye O, Doumbo O. developing research in infectious and tropical diseases in Africa: the paradigm of Senegal. *Clin Infect Dis.* 2017 Aug 15; 65(suppl\_1):S64-S69. DOI: 10.1093/cid/cix347.
  18. Dybwad M, van der Laaken AL, Blatny JM, Paauw A. Rapid Identification of *Bacillus anthracis* Spores in Suspicious Powder Samples by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Appl Environ Microbiol.* 2013 Sep;79(17):5372-83. DOI: 10.1128/AEM.01724-13
  19. Спицын АН, Уткин ДВ, Щербакова НЕ, Портенко СА, Абдраштова АС, Касьян ИА, и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ штаммов возбудителя чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2016;2:91-4. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-91-94
  20. Еременко ЕИ, Воропаев ВВ, Котенева ЕА, Рязанова АГ, Аксенова ЛЮ, Цыганкова ОИ, и др. Разработка метода анализа единичных нуклеотидных полиморфизмов *Bacillus anthracis* с использованием минисеквенирования и масс-спектрометрии. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016;11(4):565-8. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11135
  21. Ульшина ДВ, Ковалев ДА, Бобрышева ОВ, Лямкин ГИ, Худолеев АА, Сирица ЮВ, Куличенко АН. Разработка алгоритма идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Проблемы особо опасных инфекций. 2015;4:96-9.
  22. Афанасьев МВ, Миронова ЛВ, Балахонов СВ. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ для идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2015;2:3-8.
  23. Зуева ЕВ, Стоянова НА, Токаревич НК, Арег АТ. Типирование изолятов лептоспир методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Инфекция и иммунитет. 2016;6(3):33.
  24. Лопастейская ЯА, Молчанова ЕВ, Шаров ТН, Кузютина ЮА, Захарова ИБ, Викторов ДВ, Топорков АВ. Применение времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(8):502-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-502-507
  25. Cho YT, Su H, Huang TL, Chen HC, Wu WJ, Wu PC, Wu DC, Shiea J. Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. *Clin Chim Acta.* 2013 Jan 16;415:266-75. DOI: 10.1016/j.cca.2012.10.032.
  26. Ferreira L, Vega Castaño S, Sánchez-Juanes F, González-Cabrero S, Menegotto F, Orduña-Domingo A, et al. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures. *PLoS One.* 2010 Dec 6;5(12):e14235. DOI: 10.1371/journal.pone.0014235
  27. Baranov AA, Mayanskii AN, Mayanskii NA. A new epoch in medical microbiology. *Herald of the Russian Academy of Sciences.* 2015;85(6):515-22.
  28. Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *Int J Infect Dis.* 2016 Nov;52:37-42. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.09.014
  29. Šedo O, Sedláček I, Zdráhal Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass spectrometry reviews.* 2011;30(3):417-34.
  30. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol.* 2013 Aug; 11(8):574-85.
  31. Theel E. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates. *Communique Mayo Medical Laboratories.* – 2013.
  32. López-Fernández H, Santos HM, Capelo JL, Fdez-Riverola F, Glez-Peña D, Reboiro-Jato M. Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. *BMC Bioinformatics.* 2015 Oct 5;16:318. DOI: 10.1186/s12859-015-0752-4.
  33. Scott NE, Brown LM, Kristensen AR, Foster LJ. Development of a computational framework for the analysis of protein correlation profiling and spatial proteomics experiments. *J Proteomics.* 2015 Apr 6;118:112-29. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.10.024
  34. Oveland E, Muth T, Rapp E, Martens L, Berven FS, Barsnes H. Viewing the proteome: How to visualize proteomics data? *Proteomics.* 2015 Apr;15(8):1341-55. DOI: 10.1002/pmic.201400412
  35. Croxatto A, Prodhom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Mar;36(2):380-407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
  36. Swan AL, Mobasher A, Allaway D, Liddell S, Bacardit J. Application of machine learning to proteomics data: classification and biomarker identification in postgenomics biology. *OMICS.* 2013 Dec;17(12):595-610. DOI: 10.1089/omi.2013.0017.

## References

1. Kulichenko AN, Kutryev VV, Taran AV. Problematic issues of development of molecular diagnostics of dangerous infections. VII all-Russian Scientific and Practical Conference with international participation "Molecular diagnostics 2010". Vol. 1, pp. 397-400. (In Russian).
2. Dixon P, Davies P, Hollingworth W, Stoddart M, MacGowan A. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015 May;34(5):863-76. DOI: 10.1007/s10096-015-2322-0.
3. Kazemi S, Borzoueisileh S, Ebrahimpour S. Evaluation of Brucellosis in Patients and Diagnostic Tests. *Online J Anim Feed Res.* 2015;4(3):60-6.
4. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clin Chem.* 2015 Jan;61(1):100-11. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221770
5. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 1975;47:219-25.
6. Heller DN, Cotter RJ, Fenselau C, Uy OM. Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Chem.* 1987 Dec 1;59(23):2806-9.
7. Tanaka K, Fenn JB. (2002) Nobel Laureates in chemistry. Available at: <http://www.nobelprize.org> (accessed 30.03.2018)
8. Cain TC, Lubman DM, Webber WJ. Differentiation of bacteria using protein profiles from MALDI-TOF/MS. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1994;8:1026-30.
9. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay JO. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1996;10(10):1227-32.
10. Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-



- flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Aug;15(8):796-802. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02788.x.
11. Wilkins CL, Lay JO. Identification of microorganisms by mass-spectrometry. Wiley-Blackwell; 2006, 376 p.
  12. Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol.* 2010;71:149-84. doi: 10.1016/S0065-2164(10)71006-6
  13. Clark A, Kaleta E, 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 Jul;26(3):547-603. DOI: 10.1128/CMR.00072-12
  14. Blaschitz M, Meidlinger L, Sagel U, Wewalka G, Allerberger F, Indra A. Detection of highly pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Vienna, Austria, 10 – 13 April 2010. – Abstract number: P1773.
  15. Lasch P, Wahab T, Weil S, Pályi B, Tomaso H, Zange S, et al. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Results of an interlaboratory ring trial. *J Clin Microbiol.* 2015 Aug;53(8):2632-40. DOI: 10.1128/JCM.00813-15
  16. Sandalakis V, Goniotakis I, Vranakis I, Chochlakis D, Psaroulaki A. Use of MALDI-TOF mass spectrometry in the battle against bacterial infectious diseases: recent achievements and future perspectives. *Expert Rev Proteomics.* 2017 Mar;14(3):253-267. DOI: 10.1080/14789450.2017.1282825.
  17. Sokhna C, Gaye O, Doumbo O. developing research in infectious and tropical diseases in Africa: the paradigm of Senegal. *Clin Infect Dis.* 2017 Aug 15;65(suppl\_1):S64-S69. DOI: 10.1093/cid/cix347.
  18. Dybwad M, van der Laaken AL, Blatny JM, Paauc A. Rapid Identification of *Bacillus anthracis* Spores in Suspicious Powder Samples by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Appl Environ Microbiol.* 2013 Sep;79(17):5372-83. DOI: 10.1128/AEM.01724-13
  19. Spitsyn AN, Utkin DV, Shcherbakova NE, Portenko SA, Abdrashitova AS, Kas'yan IA, et al. MALDI-TOF Mass-Spectrometry Analysis of Plague Agent Strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2016;2:91-4. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-91-94 (In Russian).
  20. Eremenko EI, Voropayev VV, Kotenyova EA, Ryazanova AG, Aksyonova LYU, Tsygankova O, et al. Development of the method for analysis of *Bacillus anthracis* single nucleotide polymorphisms using the mini sequencing and mass spectrometry. *Medical news of the North Caucasus.* 2016;11(4):565-8. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11135 (In Russian).
  21. Ul'shina DV, Kovalev DA, Bobrysheva OV, Lyamkin GI, Khudoleev AA, Siritsa YuV, Kulichenko AN. Development of Algorithm for Identification of Brucellosis Agent Cultures Using MALDI-TOF Mass-Spectrometry. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2015;4:96-9. (In Russian).
  22. Afanas'ev MV, Mironova LV, Balakhonov SV. MALDI-ToF mass spectrometric analysis for the identification of plague, cholera, and tularemia causative agents. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2015;30(2):57-63.
  23. Zueva EV, Stoyanova NA, Tokarevich NK, Areg AT. Tipirovanie izolyatov leptospir metodom MALDI-TOF mass-spektrometrii. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2016;6(3):33. (In Russian).
  24. Lopasteiskaya YaA, Molchanova EV, Sharov TN, Kuziutina YuA, Zakharova IB, Victorov DV, Toporkov AV. The application of time-of-flight mass spectrometry with matrix activated laser desorption-ionization (MALDI-ToF) for identifying agents of glanders and melioidosis. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2016;61(8):502-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-502-507 (In Russian).
  25. Cho YT, Su H, Huang TL, Chen HC, Wu WJ, Wu PC, Wu DC, Shiea J. Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. *Clin Chim Acta.* 2013 Jan 16;415:266-75. DOI: 10.1016/j.cca.2012.10.032.
  26. Ferreira L, Vega Castaño S, Sánchez-Juanes F, González-Cabrero S, Menegotto F, Orduña-Domingo A, et al. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures. *PLoS One.* 2010 Dec 6;5(12):e14235. DOI: 10.1371/journal.pone.0014235
  27. Baranov AA, Mayanskii AN, Mayanskii NA. A new epoch in medical microbiology. *Herald of the Russian Academy of Sciences.* 2015;85(6):515-22.
  28. Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *Int J Infect Dis.* 2016 Nov;52:37-42. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.09.014
  29. Šedo O, Sedláček I, Zdráhal Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass spectrometry reviews.* 2011;30(3):417-34.
  30. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol.* 2013 Aug;11(8):574-85.
  31. Theel E. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates. *Communique Mayo Medical Laboratories.* – 2013.
  32. López-Fernández H, Santos HM, Capelo JL, Fdez-Riverola F, Glez-Peña D, Reboiro-Jato M. Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. *BMC Bioinformatics.* 2015 Oct 5;16:318. DOI: 10.1186/s12859-015-0752-4.
  33. Scott NE, Brown LM, Kristensen AR, Foster LJ. Development of a computational framework for the analysis of protein correlation profiling and spatial proteomics experiments. *J Proteomics.* 2015 Apr 6;118:112-29. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.10.024
  34. Oveland E, Muth T, Rapp E, Martens L, Berven FS, Barsnes H. Viewing the proteome: How to visualize proteomics data? *Proteomics.* 2015 Apr;15(8):1341-55. DOI: 10.1002/pmic.201400412
  35. Croxatto A, Prodhom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Mar;36(2):380-407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
  36. Swan AL, Mobasher A, Allaway D, Liddell S, Bacardit J. Application of machine learning to proteomics data: classification and biomarker identification in postgenomics biology. *OMICS.* 2013 Dec;17(12):595-610. DOI: 10.1089/omi.2013.0017.

---

#### Информация о соавторах:

Ульшина Диана Васильевна, младший научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
 Адрес: 355000, Ставрополь, ул. Советская, 13-15  
 Телефон: (8652) 26-0312  
 E-mail: vladidiana@yandex.ru

Кузнецова Ирина Владимировна, врач-бактериолог лаборатории биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
 Адрес: 355000, Ставрополь, ул. Советская, 13-15  
 Телефон: (8652) 26-0312  
 E-mail: labindic@mail.ru

---

#### Information about co-authors:

Diana V. Ul'shina, researcher, laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
 Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol', 355035, Russian Federation  
 Phone: (8652) 26-0312  
 E-mail: vladidiana@yandex.ru

Irina V. Kuznetsova, researcher, laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
 Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol', 355035, Russian Federation  
 Phone: (8652) 26-0312  
 E-mail: labindic@mail.ru