

Сравнение методов прямого нанесения биомассы и белковых экстрактов при идентификации микроорганизмов рода *Listeria* методом MALDI-TOF-типирования

К.В.Детушев, А.Г.Богун, Т.Н.Мухина, В.И.Соломенцев

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

Listeria monocytogenes является этиологическим агентом листериозной инфекции – широко распространенного опасного заболевания человека и животных. Заражение листериозом происходит при употреблении в пищу зараженных овощей и продуктов животного происхождения. Точное и быстрое определение возбудителя инфекции является ключом к назначению эффективного и адекватного лечения. Большой практический интерес представляет и видовая идентификация бактерий рода *Listeria*, так как у людей известны случаи заболеваний, вызванных *Listeria ivanovii*, следовательно, важно точно дифференцировать патогенные и непатогенные виды листерий. Одним из потенциально важных методов, способных решать эти задачи, является времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация MALDI-TOF, которая является удобным инструментом для анализа микроорганизмов. Вместе с тем в литературных источниках встречаются упоминания о том, что не всегда видовая идентификация бактерии рода *Listeria* методом MALDI-TOF проходит корректно. Мы предположили, что это может быть следствием влияния различных факторов, таких как условия культивирования, состав питательных сред, а также уровень полиморфизма штаммов, взятых для исследований.

В настоящей работе на 35 штаммах *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* и *L. seeligeri*, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», проведен сравнительный анализ точности идентификации при использовании двух способов пробоподготовки – метода прямого нанесения и метода экстракции белков муравьиной кислотой и ацетонитрилом. Независимо от метода нанесения принадлежность к роду *Listeria* была корректно установлена во всех образцах. Однако видовая идентификация при прямом нанесении была некорректна в девяти экспериментах, а при применении метода экстракции – в трех. Мы предполагаем, что это можно объяснить тем, что отобранные для проведения работ штаммы представляют разнородную группу клинических изолятов, выделенных на территории Российской Федерации.

Ключевые слова: листерия, масс-спектр, MALDI-TOF MS, идентификация, Microflex, MALDI-biotyper

Для цитирования: Детушев К.В., Богун А.Г., Мухина Т.Н., Соломенцев В.И. Сравнение методов прямого нанесения биомассы и белковых экстрактов при идентификации микроорганизмов рода *Listeria* методом MALDI-TOF-типирования. Бактериология. 2018; 3(3): 28–33. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-28-33

Comparing methods of direct application of biomass and protein extracts in identification of microorganisms of the genus of *Listeria* by MALDI-TOF typing method

K.V.Detushev, A.G.Bogun, T.N.Mukhina, V.I.Solomentsev

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Listeria monocytogenes is the etiological agent of listeriosis infection – a widespread dangerous disease of humans and animals. Infection with listeriosis occurs by eating infected vegetables and animal products. Accurate and quick determination of the causative agent of infection is the key to prescribing an effective and adequate treatment. Of great practical interest is the species identification of bacteria of the genus *Listeria*, since there are cases of diseases in humans caused by *Listeria ivanovii*, therefore, it is important to accurately differentiate pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. One of the potentially important methods capable of solving these problems is the time-of-flight matrix-activated laser desorption/ionization MALDI-TOF, which is a convenient tool for analyzing microorganisms. At the same time, there are references in literary sources that the species identification of a bacterium of the genus *Listeria* by the MALDI-TOF method is not always correct. We suggested that this may be due to the influence of various factors, such as cultivation conditions, the composition of nutrient media, as well as the level of polymorphism of the strains taken for research.

Для корреспонденции:

Детушев Константин Владимирович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 31-1919

E-mail: detushevkv@obolensk.org

Статья поступила 17.06.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

For correspondence:

Konstantin V. Detushev, junior researcher, collection cultures department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 31-1919

E-mail: detushevkv@obolensk.org

The article was received 17.06.2018, accepted for publication 29.10.2018

In the present work, 35 strains of *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* and *L. seeligeri* obtained from the State collection of pathogenic microorganisms "GCPM-Obolensk" carried out a comparative analysis of the accuracy of identification using two methods of sample preparation – the method of direct deposition and the method of protein extraction with formic acid and acetonitrile. Regardless of the method of application, belonging to the genus *Listeria* was correctly established in all samples. However, the species identification during direct application was incorrect in nine experiments, and when using the extraction method – in three. We assume that this can be explained by the fact that the strains selected for work represent a diverse group of clinical isolates isolated in the territory of the Russian Federation.

Keywords: *Listeria*, mass spectrum, MALDI-TOF MS, identification, Microflex, MALDI-biotyper

For citation: Detushev K.V., Bogun A.G., Mukhina T.N., Solomentsev V.I. Comparing methods of direct application of biomass and protein extracts in identification of microorganisms of the genus *Listeria* by MALDI-TOF typing method. *Bacteriology*. 2018; 3(3): 28–33. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-28-33

Род *Listeria* представляет собой группу близкородственных грамположительных факультативных анаэробов, неспорообразующих палочковидных бактерий 0,5 мкм в ширину и 1–1,5 мкм в длину. В составе рода *Listeria* выделяют 17 видов: *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* и *L. grayi*, *L. marthii*, *L. recourtae*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. fleischmannii*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia* и *L. booriae* [1, 2], из которых только *L. monocytogenes* и *L. ivanovii* считаются патогенными [3, 4]. Однако в нормативных документах РФ санитарно значимым среди бактерий рода *Listeria* считается вид *monocytogenes* [5]. Это связано с тем, что практически во всех случаях заболевание листериозами у человека вызвано *L. monocytogenes*, при употреблении зараженных пищевых продуктов [6], хотя известны у людей случаи заболеваний, вызванных *L. ivanovii* [1]. Вид *L. monocytogenes* разделяют на 13 серотипов, которые объединяют в четыре эволюционных линии: линия I (серотипы 1/2b, 3b, 4b, 4d и 4e), линия II (серотипы 1/2a, 1/2c, 3a и 3c), линия III (серотипы 4a и 4c) и линия IV (4a, 4b, 4c) [7, 8].

Времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) MALDI-TOF становится удобным инструментом для анализа микроорганизмов [9, 10]. Точность и скорость сбора данных с помощью MALDI-TOF делают этот метод потенциально важным для биологического контроля в области общественного здравоохранения, пищевой промышленности, скрининга проб крови и диагностики заболеваний бактериальной этиологии [11]. В литературных источниках встречаются упоминания о том, что не всегда видовая идентификация бактерий рода *Listeria* проходит корректно [12], например, из-за условий культивирования исследуемого микроорганизма [13].

В практике применяют несколько методов пробоподготовки бактериальной культуры для исследования методом MALDI-TOF [14]. Самым быстрым и простым методом пробоподготовки является прямое нанесение биомассы непосредственно на лунку мишени (чипа) для нанесения образцов (MSP-чипа). После высыхания образец исследуют на масс-спектрометре. Следующий метод пробоподготовки – метод экстракции белков с применением 70% этанола, 70% муравьиной кислоты и 100% ацетонитрила. Данная методика пробоподготовки применяется для неспорообразующих микроорганизмов. На первом этапе происходит приготовление бактериальной суспензии и инактивация бактериальных клеток 70% этанолом, далее, для разрушения клеточной стенки, бактериальные клетки обрабатывают 70% муравьи-

ной кислотой и для экстракции белков добавляют 100% ацетонитрил. Для спорообразующих микроорганизмов применяют метод экстракции белков с применением 80% трифторуксусной кислоты и 100% ацетонитрила. На первом этапе происходит приготовление бактериальной суспензии и инактивация бактериальных клеток с разрушением клеточной стенки 80% трифторуксусной кислотой, с последующей экстракцией белков 100% ацетонитрилом. После процедуры экстракции в обоих случаях экстракты наносят на лунку MSP-чипа и далее исследуют на масс-спектрометре.

Целью нашего исследования было изучить зависимость достоверности получаемых результатов от используемого метода нанесения анализируемого образца при идентификации микроорганизмов рода *Listeria* методом MALDI-TOF-типирования.

Материалы и методы

Штаммы и питательные среды

В работе использовали 35 штаммов рода *Listeria* видов *monocytogenes* – 17 штаммов, *innocua* – 8 штаммов, *welshimeri* – 4 штамма, *ivanovii* – 3 штамма, *grayi* – 2 штамма и *seeligeri* – 1 штамм, депонированных в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk». Полученные штаммы выращивали на плотной питательной среде №1 ГРМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ в течение 20–24 ч при температуре (37 ± 1)°C.

Идентификация штаммов рода *Listeria* с помощью MALDI-TOF-MS

Идентификацию штаммов проводили двумя методами:

1) метод прямого нанесения – одну изолированную колонию захватывали одноразовой пластиковой микробиологической петлей и равномерно наносили на лунку мишени (чипа) для нанесения образцов, затем сверху покрывали 1 мкл раствора матрицы (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, растворенной в водном растворе 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). Для каждой исследуемой единицы (колония, штамм) использовали 5 лунок для получения достоверного результата [14];

2) метод экстракции белков муравьиной кислотой и ацетонитрилом – одну изолированную колонию или часть колонии захватывали одноразовой пластиковой микробиологической петлей и переносили в чистую микроцентрифужную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл, содержащую 300 мкл ультрачистой воды (Milli-Q), и суспендировали. Затем к полученной суспензии добавляли 900 мкл 96% этанола и тщательно перемешивали на вортексе. После цен-

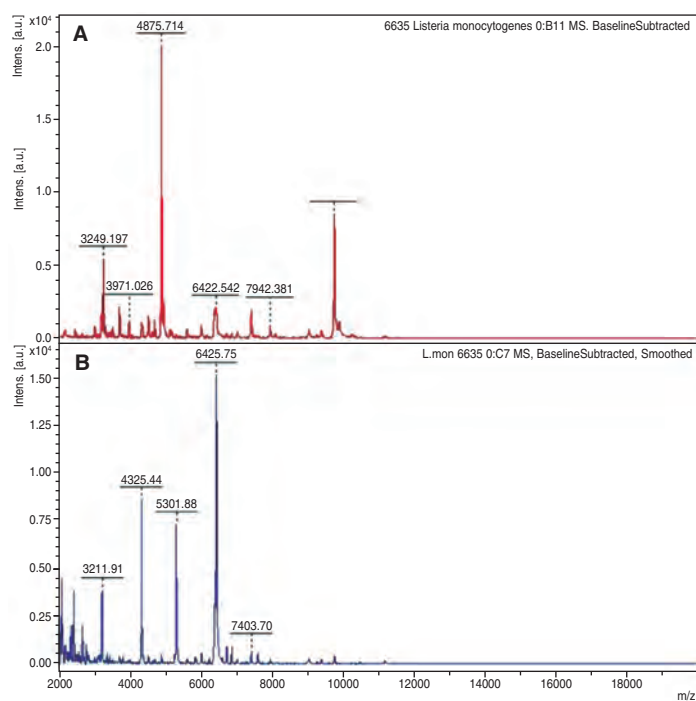


Рис. 1. А – спектр, полученный при исследовании белковых экстрактов *L. monocytogenes*. В – спектр, полученный при исследовании образца *L. monocytogenes*, непосредственно нанесенно на лунку MSP-чипа.

трифугирования в течение 2 мин при 13 000 об./мин (центрифуга Eppendorf MiniSpin), удаляли надосадочную жидкость. Для разрушения клеточной стенки к осадку добавляли 50 мкл 70% муравьиной кислоты и тщательно перемешивали. Затем для экстракции белка добавляли 50 мкл ацетонитрила. После центрифугирования в течение 2 мин при 13 000 об./мин 1 мкл супернатанта, содержащего белковый экстракт, наносили на лунку MSP-чипа и после высыхания образец покрывали 1 мкл раствора матрицы (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, растворенной в водном растворе 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты) [15].

Белковые масс-спектры получали с использованием масс-спектрометра Microflex LRF MALDI-TOF (Bruker) в линейном режиме, используя диапазон масс от 2000 до 20 000 Da. Перед каждым запуском идентификации прибор калибровался с использованием Bruker Bacterial Test Standard, содержащего в себе экстракт белков *E. coli* штамма DH5 α с добавлением двух высокомолекулярных белков РНКазы А и миоглобина.

Получение и интерпретация результатов

Создание протоколов исследования, снятие спектров и сравнение с базой масс-спектров проводили в автоматическом режиме с использованием программы MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonik), работающей совместно с flexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonik). После получения протокола исследования об уровне идентификации судили по величине коэффициен-

Таблица. Результаты идентификации спектров, полученных двумя методами пробоподготовки

| № ГКПМ-Оболенск | Вид в каталоге ГКПМ-Оболенск | Результаты идентификации MALDI-Biotyper | | | |
|-----------------|-------------------------------|---|---|-------------------------------|-------------|
| | | Метод прямого нанесения | Метод экстракции этанолом и муравьиной кислотой | Микроорганизм | Score Value |
| 4810 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,118 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,879 |
| 4908 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,052 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,143 |
| 4910 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,854 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,364 |
| 5949 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria innocua</i> | 1,734 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,419 |
| 6634 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,903 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,412 |
| 6635 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria innocua</i> | 1,967 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,41 |
| 6636 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,131 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,351 |
| 6637 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,201 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,149 |
| 6638 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,137 | <i>Listeria innocua</i> | 2,461 |
| 7271 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,029 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,551 |
| 7272 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,088 | <i>Listeria innocua</i> | 2,529 |
| 7376 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,833 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,423 |
| 7377 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,314 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,48 |
| 7378 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,73 | <i>Listeria innocua</i> | 2,337 |
| 7495 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,783 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,554 |
| 7496 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,906 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,523 |
| 7747 | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,872 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,579 |
| 6434 | <i>Listeria innocua</i> | <i>Listeria innocua</i> | 2,405 | <i>Listeria innocua</i> | 2,22 |
| 6643 | <i>Listeria innocua</i> | <i>Listeria innocua</i> | 1,93 | <i>Listeria innocua</i> | 2,534 |
| 7274 | <i>Listeria innocua</i> | <i>Listeria innocua</i> | 2,394 | <i>Listeria innocua</i> | 2,627 |
| 7379 | <i>Listeria innocua</i> | <i>Listeria innocua</i> | 2,062 | <i>Listeria innocua</i> | 2,597 |
| 7380 | <i>Listeria innocua</i> | <i>Listeria innocua</i> | 2,175 | <i>Listeria innocua</i> | 2,567 |
| 7497 | <i>Listeria innocua</i> | <i>Listeria innocua</i> | 1,749 | <i>Listeria innocua</i> | 2,561 |
| 7498 | <i>Listeria innocua</i> | <i>Listeria innocua</i> | 2,116 | <i>Listeria innocua</i> | 2,518 |
| 7748 | <i>Listeria innocua</i> | <i>Listeria innocua</i> | 2,174 | <i>Listeria innocua</i> | 2,605 |
| 4911 | <i>Listeria welshimeri</i> | <i>Listeria welshimeri</i> | 1,835 | <i>Listeria welshimeri</i> | 2,144 |
| 7382 | <i>Listeria welshimeri</i> | <i>Listeria innocua</i> | 1,931 | <i>Listeria welshimeri</i> | 2,559 |
| 7383 | <i>Listeria welshimeri</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,862 | <i>Listeria welshimeri</i> | 2,466 |
| 7499 | <i>Listeria welshimeri</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,901 | <i>Listeria welshimeri</i> | 2,317 |
| 7273 | <i>Listeria ivanovii</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,993 | <i>Listeria ivanovii</i> | 2,563 |
| 7381 | <i>Listeria ivanovii</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,888 | <i>Listeria ivanovii</i> | 2,613 |
| 7759 | <i>Listeria ivanovii</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2,223 | <i>Listeria ivanovii</i> | 2,513 |
| 6642 | <i>Listeria grayi</i> | <i>Listeria grayi</i> | 1,969 | <i>Listeria grayi</i> | 1,802 |
| 7384 | <i>Listeria grayi</i> | <i>Listeria grayi</i> | 2,297 | <i>Listeria grayi</i> | 2,441 |
| 7386 | <i>Listeria seeligeri</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1,9 | <i>Listeria seeligeri</i> | 2,262 |

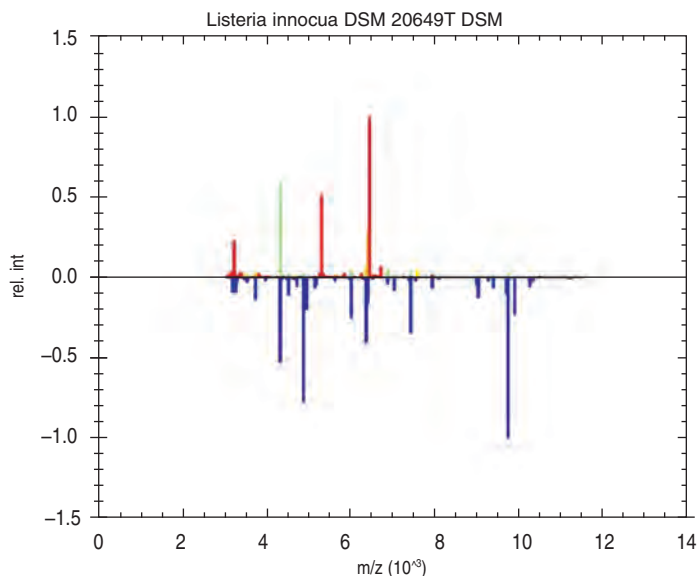


Рис. 2. Сравнение спектра из базы Bruker со спектром, полученным при исследовании образца *L. innocua*, непосредственно нанесенного на лунку MSP-чипа.

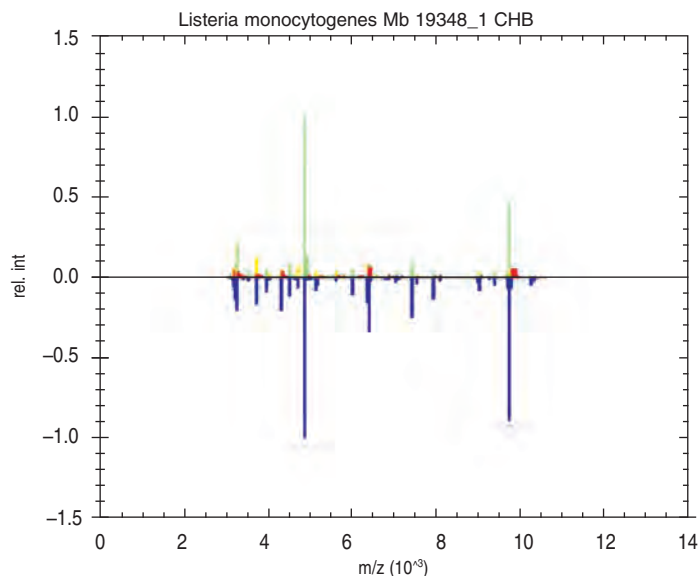


Рис. 3. Сравнение спектра из базы Bruker со спектром, полученным при исследовании белковых экстрактов *L. monocytogenes*.

та соответствия (Score Value). Согласно руководству пользователя MALDI Biotyper, интервал значения величины Score Value от 1,7 до 2,0 характеризует возможную идентификацию до рода, значение величины Score Value выше 2,0 свидетельствует о родовой идентификации, значение величины Score Value выше 2,3 соответствует достоверной идентификации до вида [16].

Результаты исследования

Проведено исследование 35 штаммов, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* и *L. seeligeri*, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk». При идентификации использовали два метода пробоподготовки: прямое нанесение части бактериальной колонии на лунку MSP-чипа и приготовление белкового экстракта с применением муравьиной кислоты и ацетонитрила. В ходе работы было проведено сравнение достоверности получаемых результатов идентификации при применении двух описанных методов нанесения исследуемых образцов.

При сравнении спектров, полученных при использовании разных методов нанесения исследуемых культур микроорганизмов, установлено, что спектры, полученные при исследовании белковых экстрактов (рис. 1А), во всех экспериментах характеризуются большим количеством регистрируемых пиков с меньшим количеством шумов по сравнению со спектрами, полученными при исследовании образцов, нанесенных непосредственно на лунку MSP-чипа (рис. 1В). В образцах, полученных при использовании процедуры экстракции, значительно улучшается идентификация белковых спектров с высокой молекулярной массой.

Также при сравнении получаемых спектров со спектрами из базы спектров Bruker спектры, полученные при исследовании образцов, непосредственно нанесенных на лунку MSP-чипа, показывали меньшее число совпадений пиков

(рис. 2) по сравнению со спектрами, полученными при исследовании белковых экстрактов (рис. 3). Зеленым обозначены пики полученного спектра, которые точно совпадают с соответствующими пиками референсного спектра из базы Bruker. Желтым обозначены пики полученного спектра, которые имеют небольшое смещение относительно соответствующих пиков референсного спектра из базы Bruker. Красным обозначены пики полученного спектра, которые имеют значительное смещение относительно соответствующих пиков референсного спектра или не имеют соответствующих пиков референсного спектра из базы Bruker.

Независимо от метода нанесения во всех экспериментах была получена надежная родовая идентификация (таблица). Однако видовая идентификация при прямом нанесении была некорректна в девяти экспериментах из тридцати пяти (выделено желтым), при этом величина значения Score Value только в одном случае была равна 2,2 (выделено красным), что характеризуется как видовая идентификация, в остальных случаях величина Score Value была ниже 1,9, что характеризуется как родовая идентификация. При применении метода экстракции в трех экспериментах из тридцати пяти видовая идентификация была некорректна (выделено зеленым), при этом величина значения Score Value во всех трех случаях превышала значение 2,3, что, в свою очередь, соответствует надежной видовой идентификации. При дальнейшем исследовании некорректно идентифицированных образцов было приготовлено по 10 экстрактов из каждого штамма и вновь идентифицировано, как описано выше. В результате около 20% вновь исследованных образцов показали некорректную видовую идентификацию. Также было отмечено, что при прямом нанесении некорректная идентификация наблюдалась на всех видах рода *Listeria*, тогда как при исследовании белковых экстрактов только в случаях идентификации *Listeria monocytogenes* на первое место в рейтинге идентификации выходил вид *innocua*. Однако на втором месте всегда был вид *monocytogenes*, со значением Score Value 2,3 и выше, характерным для надежной видовой идентификации.

Обсуждение

Метод MALDI-масс-спектрометрии, реализованный в аппаратно-программном комплексе MALDI Biotyper (Bruker Daltonik), быстро и с высокой степенью достоверности позволяет идентифицировать бактерии рода *Listeria* до уровня вида при использовании метода экстракции белков этанолом, муравьиной кислотой и ацетонитрилом.

Несмотря на то что в нормативных документах РФ санитарно значимым видом среди бактерий рода *Listeria* считается вид *monocytogenes* [5], у людей известны случаи заболеваний, вызванных *L. ivanovii* [1]. В связи с этим высокая степень достоверности дифференциации патогенных представителей рода *Listeria* от непатогенных при небольших временных (5–7 мин на образец) и на порядок меньших финансовых (по сравнению с классическими методами идентификации) затратах делает метод MALDI одним из наиболее эффективных инструментов при лабораторном исследовании пищевых продуктов животного происхождения. Также возможно применение данного метода при исследовании материала от больных листериозом и при исследовании случаев пищевых инфекций, вызываемых представителями рода *Listeria*, так как при сравнительно низких финансовых и временных затратах метода появляется возможность провести быстрое исследование большого количества проб.

Комплекс MALDI Biotyper в высокой степени применим при скрининговых работах по дифференциации непатогенных листерий, которые рассматриваются как резервуар детерминант резистентности и потенциального изменения физиологических свойств, с возможностью передачи их патогенным листериям путем горизонтального переноса [17], а также при индикации патогенных листерий в пищевых продуктах и другого исследуемого материала.

В литературе имеется противоречивая информация относительно возможностей идентификации бактерий рода *Listeria* методом MALDI. Вероятно, на возможность провести идентификацию на уровне вида оказывают влияние такие факторы, как условия культивирования, состав питательных сред, а также уровень полиморфизма штаммов, взятых для исследований. Возможно, что в тех случаях, когда исследования проводятся на типовых штаммах, вероятность успешной видовой идентификации оказывается значительно выше. В настоящем исследовании отобранные для проведения работ штаммы представляют разнородную группу клинических изолятов, выделенных на территории Российской Федерации. Вероятно, именно с этим связаны сложности, возникшие при их идентификации.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках НИР 062 «Геномный, протеомный и метагеномный анализ штаммов, депонированных в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболensk»).

Литература

1. den Bakker HC, Cummings CA, Ferreira V, Vatta P, Orsi RH, Degoricija L, et al. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is

- characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. BMC Genomics. 2010 Dec 2;11:688. DOI: 10.1186/1471-2164-11-688
2. den Bakker HC, Warchocki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS, et al. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. Int J Syst Evol Microbiol. 2014 Jun;64(Pt 6):1882-9. DOI: 10.1099/ijls.0.052720-0
 3. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J Med Microbiol. 2006 Jun;55(Pt 6):645-59. DOI: 10.1099/jmm.0.46495-0
 4. Robinson RK, Batt CA, Patel PD. (editors). Encyclopedia of Food Microbiology. San Diego, CA: Academic Press, 2000.
 5. Метод выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes* в молоке и молочных продуктах на основе гибридизационного ДНК-РНК анализа: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011, 12 с.
 6. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. Microbes Infect. 2007 Aug;9(10):1236-43. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.011
 7. Rasmussen OF, Skouboe P, Dons L, Rossen L, Olsen JE. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. Microbiology. 1995 Sep;141 (Pt 9):2053-61. DOI: 10.1099/13500872-141-9-2053
 8. Ward TJ, Ducey TF, Usgaard T, Dunn KA, Bielawski JP. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. Appl Environ Microbiol. 2008 Dec;74(24):7629-42. DOI: 10.1128/AEM.01127-08
 9. Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996;10(15):1992-6.
 10. Saenz AJ, Petersen CE, Valentine NB, Gantt SL, Jarman KH, Kingsley MT, Wahl KL. Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. Rapid Commun Mass Spectrom. 1999;13(15):1580-5.
 11. Barbudde SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, Chakraborty T, Hain T. Rapid Identification and Typing of *Listeria* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Appl Environ Microbiol. 2008 Sep;74(17):5402-7. DOI: 10.1128/AEM.02689-07
 12. Ojima-Kato T, Yamamoto N, Takahashi H, Tamura H. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Can Precisely Discriminate the Lineages of *Listeria monocytogenes* and Species of *Listeria*. PLoS One. 2016 Jul 21;11(7):e0159730. DOI: 10.1371/journal.pone.0159730
 13. Jadhav S, Gulati V, Fox EM, Karpe A, Beale DJ, Seviour D, Bhavne M, Palombo EA. Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. Int J Food Microbiol. 2015 Jun 2;202:1-9. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.023
 14. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности. Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015, 19 с.
 15. Alispahic M, Hummel K, Jandreski-Cvetkovic D, Nöbauer K, Razzazi-Fazeli E, Hess M, Hess C. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis J Med Microbiol. 2010 Mar;59(Pt 3):295-301. DOI: 10.1099/jmm.0.016576-0
 16. Alispahic M, Christensen H, Hess C, Razzazi-Fazeli E, Bisgaard M, Hess M. MALDI-TOF mass spectrometry confirms clonal lineages of *Gallibacterium anatis* between chicken flocks. Vet Microbiol. 2012 Nov 9;160(1-2):269-73. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.05.032

17. Katharios Lanwermeier S, RakicMartinez M, Elhanafi D, Ratani S, Tiedje J, Kathariou S. Coselection of cadmium and benzalkonium chloride resistance in conjugative transfers from nonpathogenic *Listeria* spp. to other *Listeriae*. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Nov;78(21):7549-56. DOI: 10.1128/AEM.02245-12
18. Cummins AJ, Fielding AK, McLauchlin J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J Infect*. 1994 Jan;28(1):89-91.
19. Guillet C, JoinLambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Méchaï F, MamzerBruneel M, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jan; 16(1):136-8. DOI: 10.3201/eid1601.091155.
14. Use of time-of-flight mass spectrometry with matrix-activated laser desorption / ionization (MALDI-ToF MS) for indication and identification of pathogenicity group I-II pathogens. Guidelines. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology, 2015, 19 p. (In Russian).
15. Alispahic M, Hummel K, Jandreski-Cvetkovic D, Nöbauer K, Razzazi-Fazeli E, Hess M, Hess C. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis *J Med Microbiol*. 2010 Mar;59(Pt 3):295-301. DOI: 10.1099/jmm.0.016576-0
16. Alispahic M, Christensen H, Hess C, Razzazi-Fazeli E, Bisgaard M, Hess M. MALDI-TOF mass spectrometry confirms clonal lineages of *Gallibacterium anatis* between chicken flocks. *Vet Microbiol*. 2012 Nov 9;160(1-2):269-73. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.05.032

References

1. den Bakker HC, Cummings CA, Ferreira V, Vatta P, Orsi RH, Degoricija L, et al. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics*. 2010 Dec 2;11:688. DOI: 10.1186/1471-2164-11-688
2. den Bakker HC, Warchocki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS, et al. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014 Jun;64 (Pt 6):1882-9. DOI: 10.1099/ijs.0.052720-0
3. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol*. 2006 Jun;55 (Pt 6): 645-59. DOI: 10.1099/jmm.0.46495-0
4. Robinson RK, Batt CA, Patel PD. (editors). *Encyclopedia of Food Microbiology*. San Diego, CA: Academic Press, 2000.
5. Method of detection and determination of bacteria *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products based on hybridization DNA-RNA analysis. Guidelines. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology, 2011, 12 c. (In Russian).
6. Swaminathan B, Gerner-Smith P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*. 2007 Aug;9(10):1236-43. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.011
7. Rasmussen OF, Skouboe P, Dons L, Rossen L, Olsen JE. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology*. 1995 Sep; 141 (Pt 9):2053-61. DOI: 10.1099/13500872-141-9-2053
8. Ward TJ, Ducey TF, Usgaard T, Dunn KA, Bielawski JP. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Dec;74(24):7629-42. DOI: 10.1128/AEM.01127-08
9. Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1996;10(15):1992-6.
10. Saenz AJ, Petersen CE, Valentine NB, Gantt SL, Jarman KH, Kingsley MT, Wahl KL. Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999;13(15):1580-5.
11. Barbudde SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, Chakraborty T, Hain T. Rapid Identification and Typing of *Listeria* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Sep;74(17):5402-7. DOI: 10.1128/AEM.02689-07
12. Ojima-Kato T, Yamamoto N, Takahashi H, Tamura H. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Can Precisely Discriminate the Lineages of *Listeria monocytogenes* and Species of *Listeria*. *PLoS One*. 2016 Jul 21;11(7):e0159730. DOI: 10.1371/journal.pone.0159730
13. Jadhav S, Gulati V, Fox EM, Karpe A, Beale DJ, Sevier D, Bhavne M, Palombo EA. Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Food Microbiol*. 2015 Jun 2;202:1-9. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.023

Информация об авторах:

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0000
 E-mail: bogun62@mail.ru

Мухина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 31-1919
 E-mail: mukhina@obolensk.org

Соломенцев Виктор Иванович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 31-1919
 E-mail: solomentsev@obolensk.org

Information about authors:

Alexander G. Bogun, PhD (Biology), head of microbial collection department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0000
 E-mail: bogun62@mail.ru

Tatyana N. Mukhina, PhD (Biology), senior researcher of the microbial collection department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-1919
 E-mail: mukhina@obolensk.org

Viktor I. Solomentsev, junior researcher of microbial collection department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-1919
 E-mail: solomentsev@obolensk.org