ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Бактериология, 2023, том 8, №1, с. 30–36
Bacteriology, 2023, volume 8, No 1, p. 30–36

DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-30-36

Методология детекции ботулотоксина типа А на масс-спектрометре типа тройного квадруполя

А.К.Сурин, А.Е.Евтюхова, М.М.Рогозин, И.Г.Шемякин, В.В.Фирстова

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

Ботулинический нейротоксин является самым токсичным природным веществом, которое может привести к летальному исходу без эффективного лечения. Ботулотоксин серотипа А (BoNT/A) – наиболее распространенный и смертельно опасный среди восьми серотипов (от А до Н). Основная проблема идентификации ботулотоксина заключается в низкой чувствительности методов. Масс-спектрометрия позволяет с высокой точностью идентифицировать ботулотоксин. Для сокращения времени анализа и повышения чувствительности метода нами были выявлены наиболее часто встречаемые пептиды ботулотоксина типа А.

В работе были проанализированы 8 образцов ботулотоксина А легкой и тяжелой цепей, имеющих различную концентрацию и выделенных в различное время разными исследователями. Были отобраны пептиды ботулотоксина типа А, которые получаются при его ферментативном расщеплении трипсином и имеют наибольшую вероятность присутствия в продуктах гидролиза. Для этих пептидов были выделены наиболее характерные ионы фрагментов для составления списка оптимальных MMP-переходов, которые можно использовать для детекции ботулотоксина в различных матрицах.

Ключевые слова: ботулотоксин, нейротоксин, масс-спектрометрия, MMP, масс-хроматограмма

Для цитирования: Сурин А.К., Евтюхова А.Е., Рогозин М.М., Шемякин И.Г., Фирстова В.В. Методология детекции ботулотоксина типа А на масс-спектрометре типа тройного квадруполя. Бактериология. 2023; 8(1): 30–36. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-30-36

Methodology for the detection of botulinum toxin type A on a triple quadrupole mass spectrometer

A.K.Surin, A.E.Evtyukhova, M.M.Rogozin, I.G.Shemyakin, V.V.Firstova

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

Botulinum neurotoxin is the most toxic natural substance that can cause death without effective treatment. Botulinum toxin of serotype A (BoNT/A) is the most common and deadly among the eight serotypes (from A to H). The main problem of identifying the botulinum toxin is the low sensitivity of the methods. Mass spectrometry reduce errors in protein identification to a minimum. To reduce analysis time and increase sensitivity, the most commonly occurring botulinum toxin type A peptides were identified. In this work, 8 samples of botulinum toxin A of light and heavy chains having different concentrations and isolated at different times by different researchers were analyzed. The peptides of botulinum toxin type A which are obtained during its enzymatic cleavage by trypsin and have the highest probability of being present in hydrolysis products were selected. The most characteristic fragment ions for these peptides were isolated to compile a list of optimal MRM transitions for monitoring the presence of this toxin in food and blood plasma.

Key words: botulinum toxin, neurotoxin, mass spectrometry, MRM, mass chromatogram

For citation: Surin A.K., Evtyukhova A.E., Rogozin M.M., Shemyakin I.G., Firstova V.V. Methodology for the detection of botulinum toxin type A on a triple quadrupole mass spectrometer. Bacteriology. 2023; 8(1): 30–36. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-30-36

Для корреспонденции:

Евтюхова Анастасия Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0046

Статья поступила 15.02.2023, принята к печати 28.04.2023

For correspondence:

Anastasia E. Evtyukhova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0046

The article was received 15.02.2023, accepted for publication 28.04.2023

Ботулотоксины (BoNTs) представляют собой нейротоксины белковой природы восьми (A–H) типов [1], продуцируемые анаэробными грамположительными спорообразующими бактериями *Clostridium botulinum* (van Ermengem), полулетальные дозы которых (LD_{50}) находятся в диапазоне 1–5 нг/кг массы тела [2]. Молекула нейротоксина ботулизма представлена гетеродимером, первоначально синтезируемым в виде единой полипептидной цепи с молекулярной массой 150 кДа. Его легкая цепь (50 кДа), состоящая из 448 аминокислотных остатков и являющаяся цинковой (Zn^{2+}) эндопептидазой, определяет его токсичность, а тяжелая цепь токсина (100 кДа), включающая аминокислотные остатки с 449 по 1280, ответственна за его связывание с пресинаптическими рецепторами и транслокацию легкой цепи через мембрану эндосом [3].

В настоящее время диагностика ботулинической интоксикации включает комбинацию культурального метода и мышиного летального теста [4]. Несмотря на довольно высокий предел детекции (10–20 пг/мл BoNT/A), она не позволяет получить лабораторное подтверждение заболевания в короткие сроки, поскольку постановка метода может занимать от 4 до 7 суток [5]. Иммуноферментным анализом, проводимым в традиционном формате, можно определять токсин в течение 5–6 ч. Однако его использование для клинической диагностики ботулинической интоксикации нецелесообразно, поскольку детектируемые концентрации токсина (0,5–2,0 нг/мл) находятся вне диагностически значимого диапазона [6]. Методом масс-спектрометрического анализа ботулотоксин может быть детектирован в течение нескольких часов, а использование, например, специфических моноклональных антител позволяет увеличивать чувствительность метода до 1 пг/мл [7].

Целью данной работы было отобрать пептиды ботулотоксина, которые получаются при его ферментативном расщеплении трипсином и имеют наибольшую вероятность присутствия в продуктах гидролиза. Для этих пептидов были выделены наиболее характерные ионы фрагментов для составления списка оптимальных MMP-переходов для использования контроля за наличием данного токсина в продуктах питания и плазме крови.

Материалы и методы

Подготовка образцов к проведению масс-спектрометрического анализа

Для выделения чистого рекомбинантного белка применяли метод электрофоретического разделения в полиакриламидном геле. На каждую концентрацию белка приходилось по три повторности. Для визуализации результатов электрофореза использовали окрашивание белков в гелях красителем Кумасси (Coomassie Blue).

Полученные белки вырезали из геля и помещали в эппендорф (1,5 мл). Для удаления SDS (Sodium dodecyl sulfate) использовали метанол (40%) и уксусную кислоту (5%). Для отмывки от красителя Кумасси добавляли 50% ацетонитрил в 50 мМ NH_4HCO_3 и инкубировали при температуре 56°C в течение 30 мин, повторяя этап до полной отмывки.

Восстановление и алкилирование дисульфидных связей проводились с использованием 5 мМ DDT (в течение 30 мин при температуре 25°C) и 15 мМ йодацетамида (в течение 30 мин при температуре 25°C).

Затем к гелю добавляли ацетонитрил (100%), после удаления которого происходило высушивание геля на вакуумном концентраторе. К полученным образцам добавляли раствор трипсина (0,01 мг/мл) в буфере 50 мМ NH_4HCO_3 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.

После гидролиза 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 масс-спектрометрическим анализом образец растворяли в 4%-м ацетонитриле и 0,1% TFA.

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ проводили на хромато-масс-спектрометре высокого разрешения. Пептиды, полученные при гидролизе ботулотоксина, предварительно разделяли с помощью нанопотокового хроматографа Easy nLC 1000 (Thermo Scientific, США), масс-спектрометрический 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% по 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.

Обработка результатов масс-спектроскопических исследований

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

Результаты и обсуждение

Стандартная процедура идентификации белка методом масс-спектрометрии основана на предварительном гидроли-

зе целевых белков одной или несколькими протеазами и последующем анализе на хромато-масс-спектрометре. В качестве протеазы нами была использована сериновая протеаза трипсин, которая расщепляет пептидные связи типа Arg-Xxx и Lys-Xxx, где Xxx может быть любая аминокислота за исключением пролина. Расщепленный трипсином белковый субстрат подвергают очистке от солей и больших недорасщепленных пептидов. Очищенные пептиды разделяли на колонке с обращенной фазой. Смываемые с колонки пептиды анализировали на масс-спектрометре. Для повышения качества детектирования белков применяли метод тандемной масс-спектрометрии, который основан на получении информации о точной массе пептида и взаимном расположении аминокислот в пептиде. В масс-спектрометрах с тандемной конфигурацией ионы пептидов могут подвергаться дополнительному воздействию (столкновению с нейтральным газом – ДАС), что приводит к развалу иона на фрагменты. Ионы-фрагменты, содержащие N-концевую часть пептида, образуют b-серию фрагментов; ионы-фрагменты, содержащие С-конец, образуют y-серию (b_n и y_n, где n – число

Таблица. **Результат обработки данных для пептидов**

№	Последовательность пептида	Масса (Да)	Встречаемость (из 8 возможных)	Расположение в белке		MMP-переход	
				начало	конец	Родительский ион, m/z	Фрагментный ион
1	FATDPAVTLAHELIHAGHR	2055,1	8	256	274	1028.5(2+) 686,0 (3+) 514,8 (4+) 412,0 (5+)	811.45(Y15, 2+)* 1069.57(Y9, 1+) 1140,61(Y10, 1+) 1253,69(Y11, 1+) 1354.74(Y12, 1+)
2	SFGHEVLNLTR	1271,7	8	210	220	636.8 (2+)	844.49(Y7, 1+) 981.55(Y8, 1+) 1038.57(Y9, 1+)
3	FSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGK	2716,3	8	231	255	1359.2(2+) 906,4 (3+)	870.50(Y9, 1+) 985.54(Y10, 1+) 1084.61(Y11, 1+) 1213.64(Y12, 1+)
4	LYYYNKFKDIASTLNK	1980,0	8	327	342	991.0 (2+) 661,0 (3+)	771,40(Y13, 2+) 852.95(Y14, 2+) 1136.64(Y10, 1+) 1378.77(Y12, 1+) 1541,80(Y13, 1+)
5	FIDSLQENEFR	1396,7	7	316	326	699.3 (2+)	822.38(Y6, 1+) 935.46(Y7, 1+) 1022.49(Y8, 1+) 1137.52(Y9, 1+)
6	FKDIASTLNK	1135,6	7	333	342	568.8 (2+)	861.47(Y8, 1+)
7	LISEEDLEDLEQK	1559,8	7	22	34	780.9 (+2) 520,9 (3+)	989.48(Y8, 1+) 1118.53(Y9, 1+) 81247.57(Y10, 1+) 1334.60(Y11, 1+)
8	TYLNFDKAVFK	1344,7	7	408	418	673.4 (2+)	968.52(Y8, 1+) 1081.61(Y9, 1+)
9	VNYTIYDGFNLR	1473,7	7	425	436	737.9 (2+)	884.43(Y7, 1+) 997.51(Y8, 1+) 1098.56(Y9, 1+) 1261.62(Y10, 1+)
10	YLLSEDTSGK	1111,5	7	364	373	556.8 (2+)	723.32(Y7, 1+) 836.40(Y8, 1+)
11	GIPFWGGSTIDTELK	1619,8	7	157	171	810.9 (2+)	1020.52(Y10, 1+) 1206.60(Y11, 1+)
12	IYSTDLGR	923,5	7	141	148	462.7 (2+)	648.33(Y6, 1+) 811.40(Y7, 1+)
13	LYGIAINPNR	1129,6	7	275	284	565.8 (2+)	684.38(Y6, 1+) 854.49(Y8, 1+)
14	ILSALEIPDVGNLSQVVVM (+15.99)K**	2140,2	7	392	411	714.4 (3+) 1071,1(2+)	806.45(Y7, 1+) 1401.67(Y13, 1+)
15	LISEEDLEDLEQK	1559,8	7	22	34	780.9 (2+) 520,9 (3+)	989.48(Y8, 1+) 1118.53(Y9, 1+) 1247.57(Y10, 1+) 1334.60(Y11, 1+)

*В скобках указан тип фрагмента иона и его заряд.
**+15,99 – означает приращение массы у метионина. Это свидетельствует о том, что метионин в этом пептиде находится в окисленной форме.

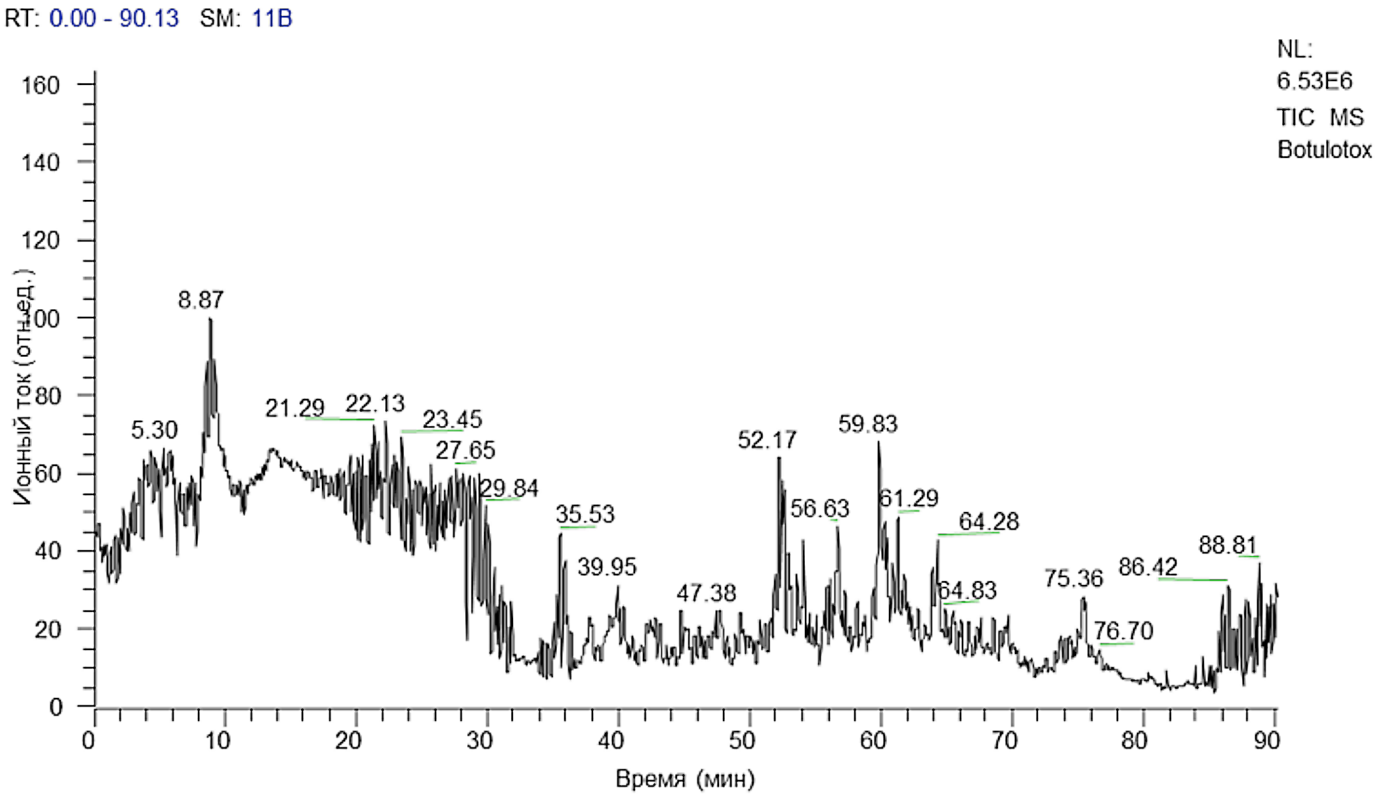


Рис. 1. **Масс-хроматограмма в полном ионном токе продуктов гидролиза легкой и тяжелой цепи ботулотоксина типа А. Выход основных пептидов наблюдается с 30-й по 80-й минуту.**

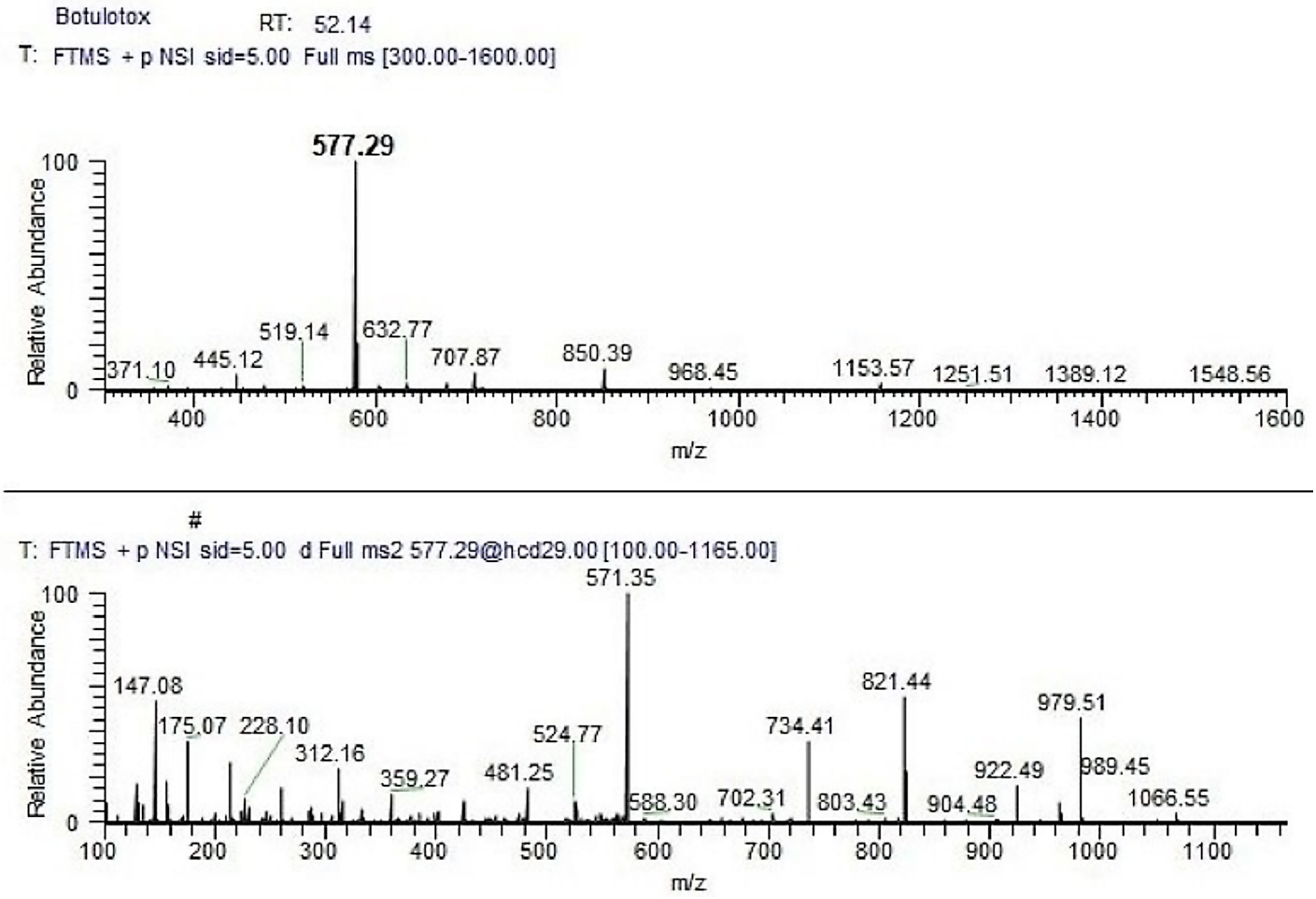


Рис. 2. **Панорамный масс-спектр ионов, время выхода 52,14 мин (верх). Спектр фрагментации двухзарядного иона с m/z = 577,29 (низ). Диапазон изоляции иона ±1, фрагментация, активированная соударением в высокоэнергетической ячейке.**

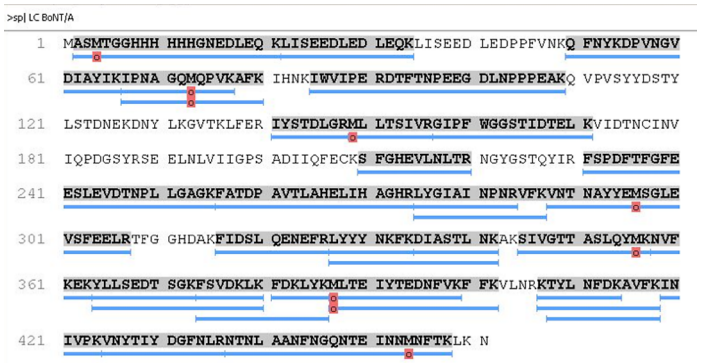


Рис. 3. **Результат обработки программой Peaks Studio 7.5 масс-спектрометрических данных. Наложения идентифицированных пептидов на аминокислотную последовательность легкой цепи ботулотоксина типа А. Темным фоном выделены участки аминокислотной последовательности, определенные методом масс-спектрометрии. Внизу последовательности указаны соответствующие найденные пептиды.**

аминокислотных остатков, входящих в данный фрагмент). Таким образом, соотношение величин масс фрагментов b и y с различными n для одного и того же пептида будет определять и взаимное расположение аминокислот в этом пептиде. Такой подход для соотнесения пептидов с конкретным белком позволяет свести ошибку в идентификации белка до минимума. С другой стороны, в таком подходе есть существенный недостаток. Он заключается в том, что в случае малой копийности целевого белка относительно других белков, также содержащихся в анализируемом образце, искомые пептиды целевого белка могут быть пропущены при анализе на фоне больших концентраций примесных пептидов. Решением данной проблемы может быть увеличение длительности хроматографического разделения пептидов.

Существует и другой вариант – использовать метод мониторинга множественных реакций (ММР). Данный метод основан на ограниченном контроле определенного числа целевых ионов и их фрагментов. Например, мы программируем наш прибор контролировать для родительского иона 737,87 m/z наличие фрагментарного иона с 997,51 m/z. При этом первый квадруполь работает как фильтр, пропуская ионы с 737,51 m/z. Во втором квадруполе прошедшие ионы сталкиваются с молекулами инертного газа, что приводит к их развалу на фрагменты. Третий квадруполь пропускает только ионы с m/z = 997,51, которые будут регистрироваться на детекторе ионов. Это называется ММР-переход (737,51 → 997,51). Величина m/z родительского иона меньше фрагментарного, так как родительский ион обладал зарядом 2+, в то время как фрагментарный ион – 1+. Работая в режиме ММР, современные приборы с конструкцией тройного квадруполя способны за 1 с поочередно проконтролировать 100–200 различных переходов. При этом влияние примесных пептидов сводится до минимума. Таким образом можно сократить время разделения пептидов и повысить чувствительность метода.

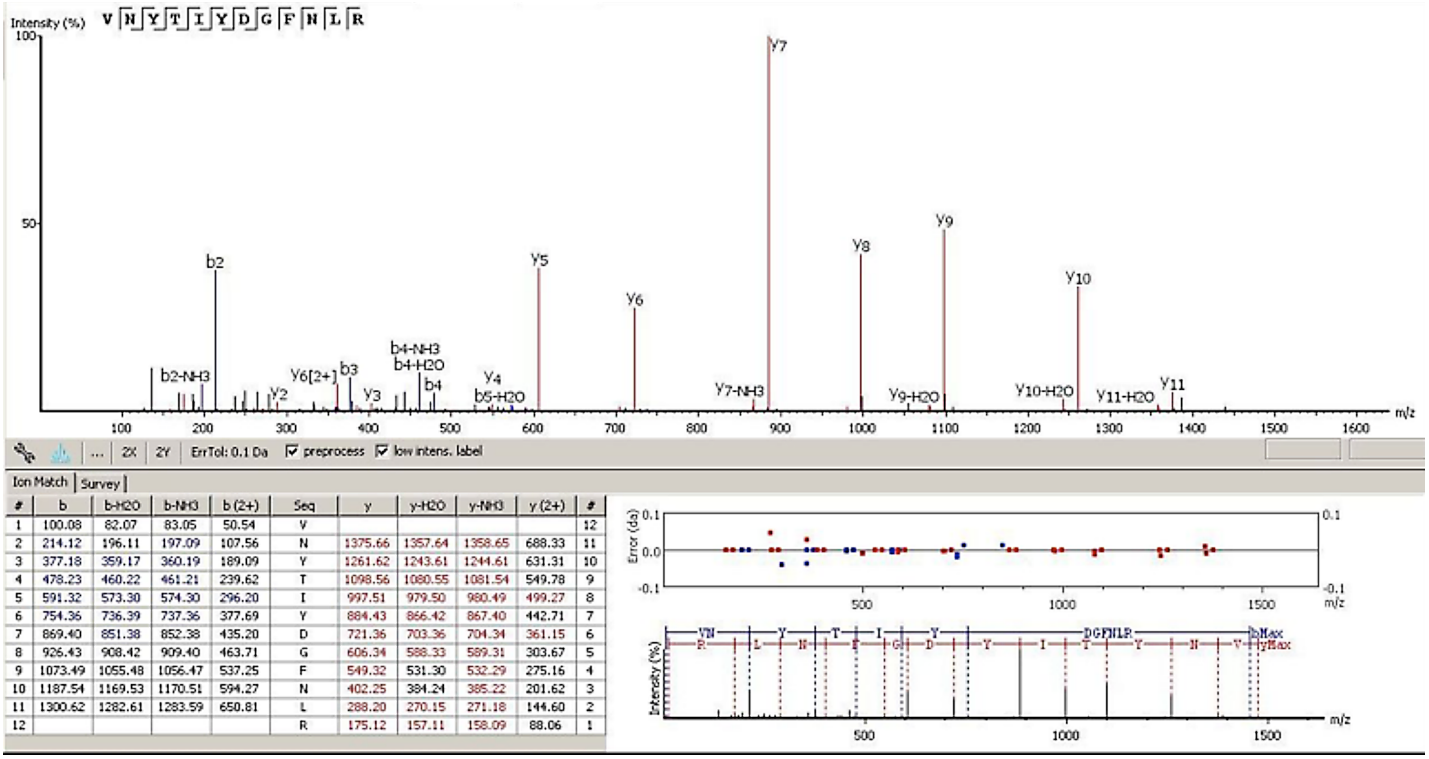
Для решения данной задачи нами были проанализированы 8 образцов ботулотоксина А легкой и тяжелой цепей, имеющих различную концентрацию и выделенных в различное время разными исследователями. На рис. 1 представлена одна из масс-хроматограмм в полном ионном токе одного из образцов продуктов трипсинового гидролиза токсина. Основной пул пептидов продуктов гидролиза элюировался с колонки в интервале времени с 30-й по 80-ю минуту. В этом промежутке времени пептиды, сходящие с колонки, ионизовались, далее в автоматическом режиме 10 ионов с максимальной амплитудой сигнала поочередно изолировали и фрагментировали методом ДАС.

На рис. 2 представлен пример работы масс-спектрометра. В начале снимается панорамный масс-спектр ионов, смываемых с колонки (например, на 52,14-й минуте, верхний рисунок), далее выбирается ион с наиболее интенсивным сигналом, этот ион изолируется и подвергается фрагментации. На нижнем рисунке представлен спектр фрагментации ДАС пептида с зарядом 2+ и величиной m/z 577,29. Далее анализируют следующий по амплитуде ион. Таким образом для каждого проанализированного пептида определяли набор масс пептида и его фрагментов. Полученные данные анализировали с использованием коммерческой программы Peaks Studio 7.5, позволяющей получить соответствие полученных комплектов масс пептидам белка.

Результат такого анализа представлен на рис. 3 – аминокислотная последовательность легкой цепи ботулотоксина в однобуквенном коде. Темным фоном отмечены участки полипептидной цепи, для которых были найдены соответствующие пептиды. Эти пептиды указаны отрезками под последовательностью. Литерой «О» отмечены метионины, которые были модифицированы (окисление метионина) в ходе пробоподготовки. Такие наборы данных были получены для всех восьми образцов как для легкой, так и для тяжелой цепи. Так как образцы имели различную концентрацию целевого белка, гидролиз образцов и пробоподготовка проводились в разное время разными исследователями, то число и положение идентифицированных пептидов для них различаются. Далее в ручном режиме были отобраны пептиды, обладающие хорошими спектрами фрагментации и встречавшиеся минимум в семи образцах из восьми. В результате были выбраны 14 пептидов для легкой цепи и два для тяжелой цепи. При этом пептид **LISEEDLEDLEQK** присутствует в гидролизате как легкой, так и тяжелой цепи.

Далее для отобранных целевых пептидов в ручном режиме подбирались пары для ММР-перехода (родительский ион → ион-фрагмент). Предпочтение отдавали наиболее интенсивным ионам-фрагментам с величиной m/z не более 1600. Это ограничение обусловлено тем, что ряд приборов с тройным квадруполем имеют ограничение верхнего диапазона m/z в районе 1600 единиц.

На рис. 4 представлен фрагмент отчета идентификации пептида **VNYTIYDGFNLR** легкой цепи ботулотоксина. Вверху представлен приведенный масс-спектр (все ионы-фрагменты представлены как однозарядные). Внизу – таблица теоретически рассчитанных ионов-фрагментов (b-серии – слева, b y-серии – справа) для пептида с данной последовательностью. Цветом выделены ионы, совпадающие с данными масс-спектрометрического анализа для этого иона. В соответствии с этими данными нами выбирались ионы фрагментов, которые имели высокую амплитуду сигнала, совпадали с теоретически рассчитанными и величина m/z которых была в пределах диапазона 600–1600. На рис. 5 представлен спектр фрагментации пептида **LISEEDLEDLEQK**. Рамками обведены значения m/z ионов-фрагментов, наиболее предпочтительных для ММР-перехода. Результаты итоговой обработ-



#	b	b-H2O	b-NH3	b (2+)	Seq	y	y-H2O	y-NH3	y (2+)	#
1	100.08	82.07	83.05	50.54	V					12
2	214.12	196.11	197.09	107.56	N	1375.66	1357.64	1358.65	688.33	11
3	377.18	359.17	360.19	189.09	Y	1261.62	1243.61	1244.61	631.31	10
4	478.23	460.22	461.21	239.62	T	1098.56	1080.55	1081.54	549.78	9
5	591.32	573.30	574.30	296.20	I	997.51	979.50	980.49	499.27	8
6	754.36	736.39	737.36	377.69	Y	884.43	866.42	867.40	442.71	7
7	869.40	851.38	852.38	435.20	D	721.36	703.36	704.34	361.15	6
8	926.43	908.42	909.40	463.71	G	606.34	588.33	589.31	303.67	5
9	1073.49	1055.48	1056.47	537.25	F	549.32	531.30	532.29	275.16	4
10	1187.54	1169.53	1170.51	594.27	N	402.25	384.24	385.22	201.62	3
11	1300.62	1282.61	1283.59	650.81	L	288.20	270.15	271.18	144.60	2
12					R	175.12	157.11	158.09	88.06	1

Рис. 4. **Результат отчета по идентификации пептида VNYTIYDGFNLR легкой цепи ботулотоксина типа А. Приведенный масс-спектр фрагментации иона пептида (верх), таблица теоретических ионов фрагментов для данного пептида (низ). Цветом выделены b- и y-ионы-фрагменты, совпадающие с пиками на спектре фрагментации.**

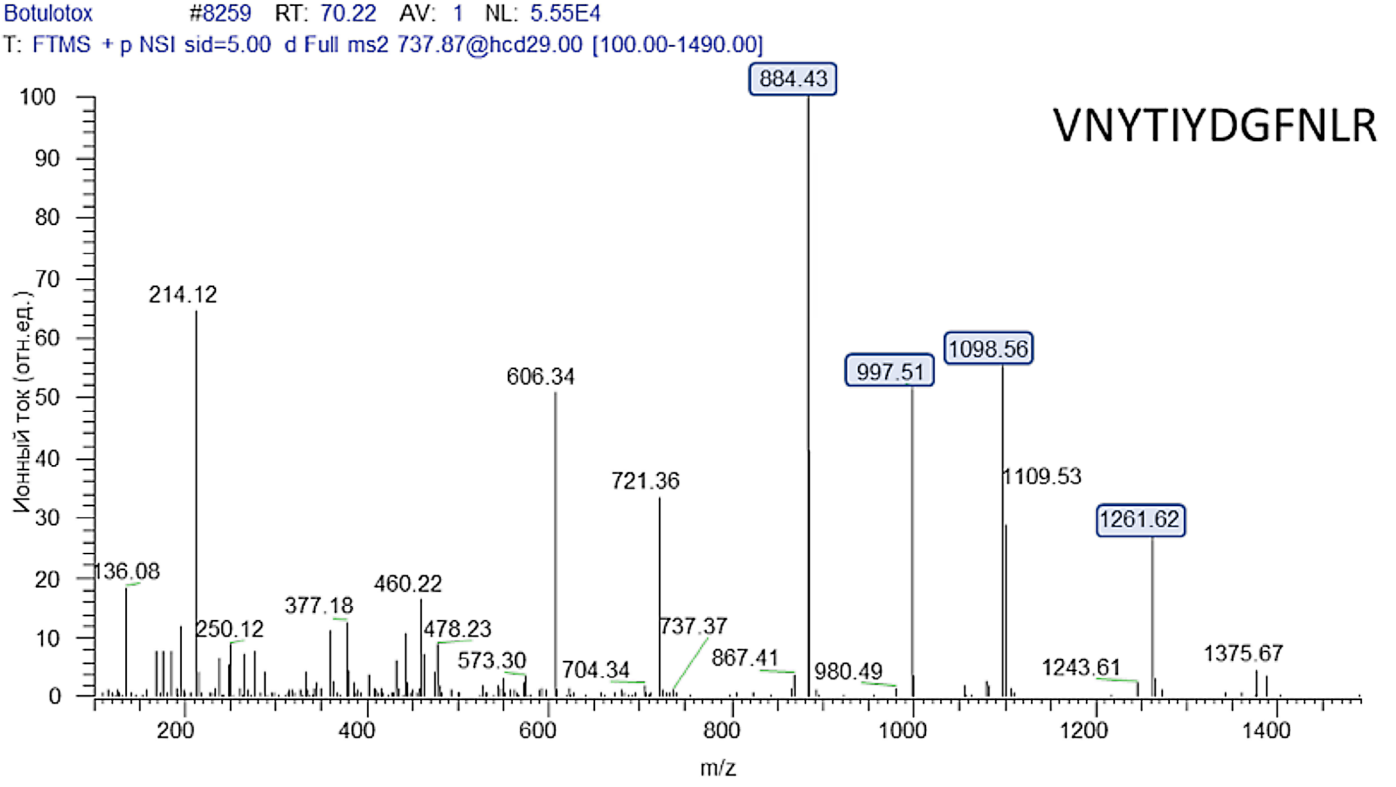


Рис. 5. **Спектр фрагментации двухзарядного иона m/z = 737,87 пептида VNYTIYDGFNLR ботулотоксина типа А. Рамками на спектре выделены величины m/z ионов-фрагментов, выбранных в качестве характерных для MRM-переходов.**

ки данных для всех 15 пептидов объединены в сводную таблицу. В колонку «родительский ион» внесены значения m/z родительского иона и его заряд. В случаях, когда родительские ионы пептидов были представлены одновременно в виде ионов с различными зарядами, в таблицу вносились все возможные варианты. Так, например, пептид **FATDPAVTLAHELIHAGHR** (№1) встречается в виде ионов с зарядом 2+, 3+, 4+ и 5+, при этом для него выбраны 5 воз-

можных ионов-фрагментов, следовательно, для этого пептида необходимо рассматривать 20 MMP-переходов либо выбрать наиболее предпочтительные (с учетом конкретного масс-спектрометрического детектора).

Заключение

Определены 15 пептидов ботулинического токсина типа А для использования их в качестве целевых пептидов при экспресс-определении наличия данного токсина в продуктах питания методом масс-спектрометрии на приборах типа тройного квадруполя. Выбраны оптимальные родительские ионы и ионы-фрагменты для MMP-переходов. Полученная база данных MMP переходов необходима для определения присутствия ботулотоксина с использованием масс-спектрометрических приборов с конструкцией тройной квадруполь, которые используются преимущественно при целевом анализе. Создаваемая нами база данных также может быть использована для анализа масс-спектрометрических данных, полученных на Q-TOF (квадруполь времяпролетный масс-спектрометр), масс-анализаторов типа орбитальных и линейных ловушек. Таким образом, база данных может применяться для широкого спектра различных масс-анализаторов.

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, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / 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. Schantz EJ, Johnson EA. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. Microbiol Rev. 1992 Mar;56(1):80-99. DOI: 10.1128/mr.56.1.80-99.1992
3. Carter AT, Peck MW. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. Res Microbiol. 2015 May;166(4):303-17. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.10.010
4. Singh AK, Stanker LH, Sharma SK. Botulinum neurotoxin: where are we with detection technologies? Crit Rev Microbiol. 2013 Feb;39(1):43-56. DOI: 10.3109/1040841X.2012.691457
5. Lindström M, Myllykoski J, Sivelä S, Korkeala H. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. Crit Rev Food Sci Nutr. 2010 Apr;50(4):281-304. DOI: 10.1080/10408390802544405
6. Masters AM, Palmer DG. Confirmation of botulism diagnosis in Australian bird samples by ELISA and RT rtPCR. J Vet Diagn Invest. 2021 Jul;33(4):684-694. DOI: 10.1177/10406387211014486
7. Cheng LW, Henderson TD 2nd, Lam TI, Stanker LH. Use of Monoclonal Antibodies in the Sensitive Detection and Neutralization of Botulinum Neurotoxin Serotype B. Toxins (Basel). 2015 Nov 27;7(12):5068-78. DOI: 10.3390/toxins7124863

Информация о соавторах:

Сурин Алексей Константинович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Шемякин Игорь Георгиевич, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Information about co-authors:

Alexey K. Surin, PhD (Physical and Mathematical Sciences), Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

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

Igor G. Shemyakin, PhD, DSc (Biological Science), Professor, Deputy Director for Research, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

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