

Hospitals And Their Hygienic And Epidemiological Significance: Dis. Dushanbe; 2000. (in Russian)

18. Sidorenko S.V. Microbiological aspects of surgical infections. *Infektsii v khirurgii*. 2003; 1: 22–7. (in Russian)
19. Orlova O.A., Akimkin V.G. Microbiological monitoring of ventilator-associated respiratory tract infections in patients with severe trauma. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2014; 1: 32–42. (in Russian)
20. Brusina E.B., Rychagov I.P. *Epidemiology of Nosocomial Infections of Septic Surgery*. Nauka, Novosibirsk; 2006 (in Russian). [Brusina E.B., Rychagov I.P. *Jepidemiologija vnutribol'nichnyh gnojno-septicheskih infekcij v hirurgii*. Novosibirsk: Nauka; 2006].

Поступила 28.06.14
Received 28.06.14

Сведения об авторах:

Акимкин Василий Геннадьевич член-корреспондент РАМН, доктор мед. наук, проф., зам. директора ФБУН «НИИ дезинфектологии» Роспотребнадзора, зав. каф. дезинфектологии ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, вед. науч. сотр. ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора; **Чистова Анна Владимировна**, гл. специалист Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Челябинской области, Челябинск; **Ефремова Наталья Петровна**, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. гигиены и эпидемиологии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 614.777:79.843.1]-078-074:543.42.062

Миронова Л.В., Басов Е.А., Афанасьев М.В., Хунхеева Ж.Ю., Миткеева С.К., Ганин В.С., Урбанович Л.Я., Куликалова Е.С., Гольдапель Э.Г., Балахонов С.В.

MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ С МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИЕЙ *VIBRIO SPP.* В СИСТЕМЕ МОНИТОРИНГА ВИБРИОФЛОРЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 664047, Иркутск, Россия

Проведена оценка эффективности применения прямого белкового профилирования на основе MALDI-ToF масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов рода *Vibrio* при мониторинге вибриофлоры поверхностных водоемов, осуществляемом в рамках эпидемиологического надзора за холерой. Сопоставление результатов MALDI-ToF масс-спектрометрического и бактериологического определения таксономической принадлежности 583 морфологически сходных с холерным вибрионом колоний (отобранных при бактериологическом исследовании проб из объектов окружающей среды Иркутска в 2012–2013 гг.) с последующей выборочной идентификацией на основании анализа структуры генов *16S rRNA* и *rpoB* показало высокую диагностическую чувствительность и специфичность масс-спектрометрии. Полученные данные определяют целесообразность включения MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа в схему микробиологического исследования при мониторинге вибриофлоры поверхностных водоемов.

Ключевые слова: эпидемиологический надзор; мониторинг вибриофлоры; *Vibrio cholerae*; MALDI-ToF масс-спектрометрия, геноидентификация.

Для цитирования: *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19(6): 27–36.

Mironova L.V., Basov E.A., Afanasev M.V., Khunkheeva Zh. Yu., Mitkeeva S.K., Ganin V.S., Urbanovich L. Ya., Kulikalova E.S., Goldapel E.G., Balakhonov S.V.

MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY ANALYSIS WITH MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF *VIBRIO SPP.* IN THE SYSTEM OF THE MONITORING OF *VIBRIO* FLORA OF SURFACE WATER RESERVOIRS

Irkutsk Research Institute of Plague Control of Siberia and the Far East of the Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare 78, Trilissera Str., Irkutsk, Russian Federation, 664047

There is presented the assessment of the efficacy of the application of direct protein profiling on the basis of MALDI-ToF mass-spectrometry for identification of *Vibrio spp.* during monitoring of *Vibrio* flora in surface water reservoirs implemented in the network of cholera surveillance. The comparison of results of The MALDI-ToF MS and bacteriological detection of taxonomic belonging of 583 colonies morphologically similar to *Vibrio cholerae* (isolated in bacteriological examination of samples from environmental objects in Irkutsk city in 2012–2013) with following random identification based on *16S rRNA* and *rpoB* gene structure showed high diagnostic sensitivity and specificity of mass-spectrometry. The findings determine the expediency of the inclusion of MALDI-ToF MS in the layout of microbiological examination in the monitoring of *Vibrio* flora in surface water reservoirs.

Key words: epidemiological surveillance; *Vibrio* flora monitoring; *Vibrio cholerae*; MALDI-ToF mass-spectrometry; gene identification.

Citation: *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni*. 2014; 19(6): 27–36.

Для корреспонденции (Correspondence to): **Миронова Лилия Валерьевна**, канд. мед. наук, зав. лаб. холеры, e-mail: mironova-lv@yandex.ru

Глобализация в современном мире оказывает существенное влияние на эпидемический процесс, способствуя ускорению темпов распространения инфекционных заболеваний как на внутриматеринском, так и на межконтинентальном уровне, изменению биологических свойств возбудителей, трансформации среды обитания микроорганизмов, снижению резистентности макроорганизма [1]. Эти тенденции свойственны и для холеры, ситуация по которой в мире характеризуется высокими показателями заболеваемости за счет вовлечения в эпидемический процесс новых регионов, появлением измененных форм возбудителя с повышенным патогенным потенциалом, вероятностью завоза инфекции на свободные от холеры территории, в том числе невыявленными вибрионосителями, больными легкими и стертыми формами или больными в инкубационном периоде болезни, что определяет риск попадания возбудителя в поверхностные водоемы и накопления его в благоприятных экологических нишах [2–5]. С учетом этого важная роль в системе эпидемиологического надзора за холерой в РФ отводится мониторинговым исследованиям, направленным на своевременную индикацию и идентификацию возбудителя в объектах окружающей среды. Одной из актуальных задач совершенствования микробиологического мониторинга особо опасных инфекций является внедрение современных высокотехнологичных подходов к детекции генетических, белковых и антигенных детерминант патогена на основе геномного, протеомного, иммунохроматографического и других видов анализа [6, 7].

В последние годы интенсивно развивается технология идентификации микроорганизмов на основе профиля референсных белков микробной клетки с использованием MALDI ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетным разделением) масс-спектрометрии. Принцип идентификации с применением MALDI-ToF заключается в сопоставлении белковых паттернов исследуемого микроорганизма с масс-спектрами базы данных и определении на основании этого его таксономической принадлежности [8]. MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ характеризуется высокой специфичностью, скоростью и простотой постановки, успешно применяется в клинической лабораторной диагностике широкого круга инфекций [8–10]. Высокая эффективность масс-спектрометрии показана при идентификации и углубленной характеристике холерного вибриона, других микроорганизмов рода *Vibrio* и близкородственных таксономических групп [11–17], бактериологическом исследовании балластных вод морских судов [18]. Учитывая информативность и экспрессность MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа, существует необходимость исследования перспектив внедрения метода в схему лабораторной диагностики холеры для ускоренной идентифика-

ции культур, изолируемых из объектов окружающей среды.

Цель исследования – оценка эффективности применения прямого белкового профилирования на основе MALDI-ToF масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов рода *Vibrio* в системе мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов.

Материалы и методы

В работе проведено исследование 583 морфологически сходных с холерным вибрионом колоний, отобранных с плотных питательных сред в ходе бактериологического исследования 1872 проб из объектов окружающей среды Иркутска в 2012–2013 гг.

Бактериологически принадлежность исследуемых культур к роду *Vibrio* определялась в соответствии с МУК «Лабораторная диагностика холеры» [19]. Для предварительной идентификации использовались определение индофенолоксидазы, оценка типа расщепления глюкозы, подвижности и декарбоксилазной/дигидролазной активности в отношении аминокислот. Окончательная идентификация культур проводилась по комплексу культурально-морфологических, биохимических, серологических тестов.

Масс-спектрометрическому исследованию подвергались колонии после предварительной постановки ориентировочной реакции агглютинации со специфическими холерными O1-, O139- и O-сыворотками. Подготовка образцов для масс-спектрометрического анализа неагглютинирующихся холерными сыворотками культур осуществлялась прямым нанесением исследуемой культуры на MSP-чип (MSP96, «Bruker Daltonics», Германия) с последующим наслаиванием 1 мкл насыщенного раствора матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота в 50 % ацетонитрила и 2,5 % трифторуксусной кислоты). Для агглютинирующихся культур проводилась предварительная экстракция белка посредством обработки микробной взвеси этиловым спиртом и 70% муравьиной кислотой с последующим добавлением ацетонитрила. По окончании экстракции по 1 мкл супернатанта анализируемых образцов переносилось в лунки MSP-чипа, образцы подсушивались на воздухе, сверху наносился 1 мкл матрицы. В качестве калибровочного стандарта и положительного контроля использовался белковый экстракт штамма *E. coli* DH5a (ref. № 255343; «Bruker Daltonics», Германия).

Получение спектров осуществлялось в автоматическом режиме на масс-спектрометре Microflex™ LT MALDI-ToF («Bruker Daltonics», Германия) с использованием программы Flex Control (ver. 3.3, build 108). Белковые паттерны идентифицировались в программе MALDI Biotyper 3.0 («Bruker Daltonics», Германия), база данных которой была расширена нами ранее за счет внесения референсных спектров штаммов *V. cholerae* [14, 16]. Таксономическая

Последовательности праймеров и референсные штаммы для анализа генов *rpoB* и *16S rRNA*

Ген	Последовательность праймеров 5'-3'	Источник литературы	Референсная нуклеотидная последовательность	
			наименование и номер штамма	регистрационный номер в GenBank
<i>rpoB</i> (RNA polymerase beta subunit)	1110F GTAGAAATCTACCGCATG ATG	23	<i>V. cholerae</i> N16961	AE003852.1
	CM32b CGGAACGGCCTGACGTTGCAT		<i>V. metschnikovii</i> LMG 11664	FN423806.1
			<i>V. fluvialis</i> 2403-00	EF064368
<i>16S rRNA</i> (<i>16S ribosomal RNA</i>)	519F CAGCMGCCGCGGTAATWC	22	<i>V. cholerae</i> N16961	AE003852.1
	1406R ACGGGCGGTGTGTRC		<i>V. metschnikovii</i> NCTC 11170	X74712
			<i>V. fluvialis</i> ATCC 33809	NR_119053

принадлежность микроорганизма и достоверность идентификации определялись в соответствии со значением индекса совпадения (score value – SV).

Выборочная геноидентификация культур осуществлялась на основании определения нуклеотидной последовательности таксономически информативных генов – *rpoB* и *16S rRNA* [20, 21]. ДНК из исследуемых образцов экстрагировалась с использованием стандартных наборов РибоПреп (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Москва), для амплификации использовалось 10 нг ДНК. Амплификация проводилась с использованием указанных в табл. 1 праймеров [22, 23] по программе: стартовая денатурация 95°C – 5 мин; 32 цикла: 95°C – 40 с, 60°C – 40 с, 72°C – 90 с; заключительная элонгация 72°C – 5 мин. Ампликоны очищались ферментной смесью (10 Ед экзонуклеазы I и 1 Ед щелочной фосфатазы). Секвенирование генов *rpoB* и *16S rRNA* выполнялось с прямого и обратного праймеров с использованием ABI Prism BigDye v.1.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit и ДНК-анализатора ABI Prism 3500 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

Консенсусные последовательности секвенированных фрагментов ДНК определялись с применением программы VectorNTI v. 10.0 (Invitrogen Corp., США). Для идентификации на основании сопоставления нуклеотидных последовательностей генов *rpoB* и *16S rRNA* исследуемых штаммов с последовательностями базы данных GenBank использовалась программа blastn пакета программ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Последовательности гена *16S rRNA* дополнительно анализировались с использованием базы данных проекта RDP версия 11,2 (Ribosomal Database Project, <http://rdp.cme.msu.edu>, содержит информацию о 2 922 433 аннотированных последовательностях гена *16S rRNA*) и сетевого ресурса Ridom 16S rDNA (Ribosomal Differentiation of Microorganisms, <http://www.ridom.de/rdna>), позволяющих проводить on line идентификацию микроорганизмов по структуре указанного гена. При определении таксономической принадлежности оценивался

уровень гомологии исследуемых локусов с соответствующими нуклеотидными последовательностями генов типовых штаммов из коллекций бактериальных культур (NCTC, ATCC) или последовательностями штаммов, принятых в качестве референсных при молекулярно-генетических исследованиях (в частности, штамм *V. cholerae eltor* N16961) (см. табл. 1). Кластерный анализ проводился с использованием инструментов программы Bionumerix 6.0 (Applied Maths, Бельгия) по алгоритму UPGMA. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов *16S rRNA* и *rpoB* депонированы в GenBank под инвентарными номерами KM209331-209333, KM262182-262187, KM364530-364536, KM396324-396334.

Чувствительность и специфичность методов идентификации оценивались в соответствии с рекомендациями, представленными в курсе доказательной медицины университета штата Мичиган, США (<http://omerad.msu.edu/ebm/Diagnosis/Diagnosis4.html>).

Результаты и обсуждение

Микробиологический мониторинг вибриофлоры поверхностных водоемов Иркутска проводится ежегодно в 16 стационарных эпидемиологически обоснованных точках. В летне-осенний период 2012-2013 гг. из водных объектов Иркутска исследовано 1872 пробы воды и иловых отложений. В процессе микробиологического анализа указанных проб с плотных питательных сред отобраны 583 колонии, морфологически сходные с холерным вибрионом. Предварительная бактериологическая идентификация показала принадлежность к *Vibrio cholerae* 170 колоний из 65 проб воды и ила, к *V. fluvialis* – 9 колоний из 4 проб и к *V. metschnikovii* – 6 колоний из 4 проб (табл. 2). Среди отнесенных к *V. cholerae* культур по результатам окончательной идентификации две охарактеризованы как *V. cholerae eltor* O1-серогруппы, остальные – как *V. cholerae* не O1/O139-серогрупп.

MALDI-ToF масс-спектрометрически идентифицировано как *V. cholerae* 220 колоний из 77 проб с индексом совпадения в диапазоне от 2,21

Результаты MALDI-ToF масс-спектрометрической и бактериологической идентификации

Год	Количество исследованных колоний	Идентифицированный вид микроорганизма	Результаты идентификации				
			MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ		бактериологический анализ ¹		
			количество идентифицированных колоний	max score value	количество идентифицированных культур	количество идентифицированных колоний	количество идентифицированных культур
2012	179	<i>V. cholerae</i>	30	2,12–2,58	21	26	20
		<i>V. fluvialis</i>	2	2,25–2,31	2	1	1
2013	404	<i>V. cholerae</i>	190	2,34–2,69	56	144	45
		<i>V. fluvialis</i>	8	2,25–2,38	3	8	3
		<i>V. metschnikovii</i>	13	1,87–1,97	6	6	4

Примечание. ¹ – предварительная идентификация по комплексу культурально-морфологических и биохимических тестов (индофеноксидаза, окисление и ферментация глюкозы, декарбоксилазная и дигидролазная активность в отношении аминокислот).

(достоверная идентификация до рода, вероятная – до вида) до 2,69 (достоверная идентификация до вида). При этом достоверная идентификация до вида (SV выше 2,30) установлена в 99,1 % случаев (218 колоний).

Соответственно по результатам масс-спектрометрического анализа за период 2012–2013 гг. идентифицировано 77 культур холерного вибриона, тогда как при бактериологическом исследовании их количество составило 65. Отрицательный результат бактериологической идентификации группы масс-спектрометрически положительных культур *V. cholerae* ($n=12$) во всех случаях оказался обусловлен их активностью в отношении аминокислот, а именно наличием не только декарбоксилаз лизина и орнитина, но и дигидролазы аргинина, что не позволяет отнести их к роду *Vibrio* виду *cholerae*. При этом повторный анализ декарбоксилазной/дигидролазной активности с интервалом 7 дней у трех культур выявил типичную для *V. cholerae* характеристику, остальные сохранили исходные фенотипические свойства.

Что касается других представителей рода *Vibrio*, то при прямом белковом профилировании 10 колоний (из 5 проб) идентифицировано как *V. fluvialis* и 13 (из 6 проб) – как *V. metschnikovii*. Необходимо отметить, что идентификация по белковому паттерну *V. metschnikovii* прошла лишь на уровне «вероятной до рода» с индексом совпадения, не превышающим 1,97.

На основании полученных данных проведен расчет диагностической чувствительности и специфичности MALDI-ToF масс-спектрометрической идентификации в сравнении с бактериологической. В результате установлено, что чувствительность масс-спектрометрии составила 100 % (все отнесенные по данным бактериологического анализа к роду *Vibrio* колонии соответствовали указанному роду и по белковому профилю). Специфичность же метода определена на уровне 85,4 %, что обусловлено наличием колоний, белковые спектры которых соответствуют спектрам микроорганизмов рода *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*) из базы данных MALDI

Biolyser 3.0, не относящихся к указанным таксонам по бактериологическим тестам.

Расхождение результатов идентификации ряда культур с использованием классического бактериологического метода и прямого белкового профилирования определяет необходимость их дальнейшего изучения. В настоящее время в качестве альтернативного высокоэффективного метода в таксономии и изучении филогении микроорганизмов используется геноидентификация, основанная на изучении таксономически информативных маркеров. Одним из широко применяемых с этой целью стандартных генетических маркеров является ген, кодирующий синтез *16S rRNA*. Указанный ген присутствует в геноме практически всех микроорганизмов, часто в виде множественных копий, характеризуется достаточной для анализа протяженностью и в меньшей степени подвержен изменчивости во времени [20]. Для достоверной видовой идентификации микроорганизмов по структуре гена *16S rRNA* единых требований не установлено, но рекомендован ряд критериев – в частности размер анализируемого участка гена должен составлять не менее 500–525 п.о.; при отнесении к тому или иному виду идентичность анализируемых нуклеотидных последовательностей должна быть не менее 99 % по сравнению с типовыми или референсными штаммами [20, 24]. Вместе с тем в ряде случаев видовая дифференциация микроорганизмов отдельных родов, в том числе и некоторых видов рода *Vibrio*, с использованием данного генетического маркера затруднена в связи с его высокой консервативностью [18, 20, 25]. Поэтому в бактериальной таксономии для идентификации предложено использовать анализ структуры другого универсального гена «домашнего хозяйства» – *rpoB*, кодирующего β -субъединицу РНК-полимеразы. Более высокий уровень дивергенции нуклеотидных последовательностей гена *rpoB* в сравнении с геном *16S rRNA* в отдельных таксономических группах дает основание рассматривать его в качестве эффективного инструмента микробной идентификации как на видовом, так и на внутривидовом уровне [21, 26].

Результаты выборочной геноидентификации культур, отнесенных к роду *Vibrio* по данным MALDI ToF масс-спектрометрии

Наименование исследуемого образца	Принадлежность к роду <i>Vibrio</i> по данным бактериологической идентификации ¹	Данные MALDI ToF масс-спектрометрии			Результаты геноидентификации				
		идентифицированный вид	max score value	анализируемый участок гена референсного штамма ²	<i>rpoB</i>	% идентичности	<i>16S rRNA</i>		% идентичности
					идентифицированный вид		анализируемый участок гена референсного штамма ²	идентифицированный вид	
Колония 1	Не относится	<i>V. cholerae</i>	2,53	1303–2102	<i>V. cholerae</i>	99,75	566-1336	<i>V. cholerae</i>	100,00
Колония 2	"	<i>V. cholerae</i>	2,39	1303–2102	<i>V. cholerae</i>	99,75	566-1336	<i>V. cholerae</i>	100,00
Колония 3	"	<i>V. cholerae</i>	2,47	1303–2102	<i>V. cholerae</i>	99,88	566-1336	<i>V. cholerae</i>	100,00
Колония 4	"	<i>V. cholerae</i>	2,57	1303–2102	<i>V. cholerae</i>	99,25	566-1336	<i>V. cholerae</i>	100,00
<i>V. cholerae</i> не O1/O139 1-13	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cholerae</i>	2,46	1303–2102	<i>V. cholerae</i>	98,75	566-1336	<i>V. cholerae</i>	99,74
<i>V. cholerae</i> не O1/O139 10-13	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cholerae</i>	2,47	1303–2102	<i>V. cholerae</i>	99,75	566-1336	<i>V. cholerae</i>	100,00
<i>V. cholerae</i> И-1300	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cholerae</i>	2,71	1303–2102	<i>V. cholerae</i>	100,00	566-1336	<i>V. cholerae</i>	100,00
<i>V. cholerae</i> И-1501	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cholerae</i>	2,55	1303-2102	<i>V. cholerae</i>	100,00	566-1336	<i>V. cholerae</i>	100,00
<i>V. cholerae</i> И-1447	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cholerae</i>	2,52	1303–2102	<i>V. cholerae</i>	99,62	566-1336	<i>V. cholerae</i>	99,74
Колония 5	Не относится	<i>V. metschnikovii</i>	1,97	1–871	<i>V. metschnikovii</i>	100,00	576–1355	<i>V. metschnikovii</i>	99,49
Колония 6	"	<i>V. metschnikovii</i>	1,97	1–871	<i>V. metschnikovii</i>	99,54	576–1355	<i>V. metschnikovii</i>	99,49
<i>V. metschnikovii</i> 1-13	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. metschnikovii</i>	1,91	1–871	<i>V. metschnikovii</i>	95,06	576-1355	<i>V. metschnikovii</i>	99,23
Колония 7	Не относится	<i>V. fluvialis</i>	2,25	14–821	<i>V. fluvialis</i>	99,75	563–1396	<i>V. fluvialis</i>	100,00
<i>V. fluvialis</i> 2-12	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. fluvialis</i>	2,31	14–821	<i>V. fluvialis</i>	99,75	563-1396	<i>V. fluvialis</i>	100,00
<i>V. fluvialis</i> 1-13	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. fluvialis</i>	2,38	14–821	<i>V. fluvialis</i>	99,38	563–1396	<i>V. fluvialis</i>	99,74

Примечание. ¹ – предварительная идентификация по комплексу культурально-морфологических и биохимических тестов (индофенолоксидаза, окисление и ферментация глюкозы, декарбоксилазная и дегидралазная активность в отношении аминокислот); ² – указаны нуклеотидные позиции гена референсного штамма. Штаммы, используемые в качестве референсных, представлены в табл. 1.

Основываясь на этих данных, для уточнения диагностических параметров масс-спектрометрической идентификации изучаемых культур и подтверждения их таксономической принадлежности нами проведена выборочная геноидентификация на основании секвенирования фрагментов двух генов: *16S rRNA* и *rpoB*. Структура указанных локусов определялась в геноме 9 культур, идентифицированных по масс-спектрометрии как *V. cholerae* (в том числе 2 культуры бактериологически охарактеризованы как *V. cholerae* не O1/O139 №1-13, 10-13, 1 – *V. cholerae* eltor O1 *ctxA*⁺ *tcpA*⁺ № И-1300, 1 – *V. cholerae* eltor O1 *ctxA*⁺ *tcpA*⁺ № И-1501, 1 – *V. cholerae* eltor O1 *ctxA*⁺ *tcpA*⁺ № И-1447 и 4 – по комплексу бактериологических тестов к роду *Vibrio* не относятся, условно обозначенные как «колонии 1-4»); трех культур – *V. metschnikovii* («колонии 5, 6», отнесенные к указанному виду по масс-спектрометрии с низким SV и бактериологически подтвержденная культура с низким SV – *V. metschnikovii* 1-13); трех культур *V. fluvialis* («колония 7», идентифицированная по масс-спектрометрии и две культуры *V. fluvialis*, принадлежность к данному виду которых определена как бактериологически, так и по белковому профилю) (табл. 3).

В результате при анализе гена *16S rRNA* с использованием пакета программ BLAST все исследуемые культуры *V. cholerae* ($n=9$) продемонстрировали высокий процент идентичности (от 99,74 до 100 %) нуклеотидной последовательности данного гена с последовательностью референсного штамма *V. cholerae* N16961. При этом различия анализируемого участка гена по двум позициям выявлены у двух штаммов, отнесенных к *V. cholerae* как по масс-спектрометрическим, так и по бактериологическим данным. Установленный уровень гомологии нуклеотидных последовательностей гена *16S rRNA* подтверждает принадлежность взятых в исследование культур к *V. cholerae*. Аналогичный результат идентификации получен и при анализе указанных культур с применением базы данных проекта RDP. Определение же таксономической принадлежности в проекте Ridom *16S rDNA* оказалось невозможным в связи с отсутствием в базе данных информации о микроорганизмах рода *Vibrio*.

Также по структуре гена *16S rRNA* подтверждена принадлежность к виду трех тестируемых культур *V. fluvialis* как с использованием BLAST (идентичность с референсной последовательностью от 99,74 до 100 %), так и RDP.

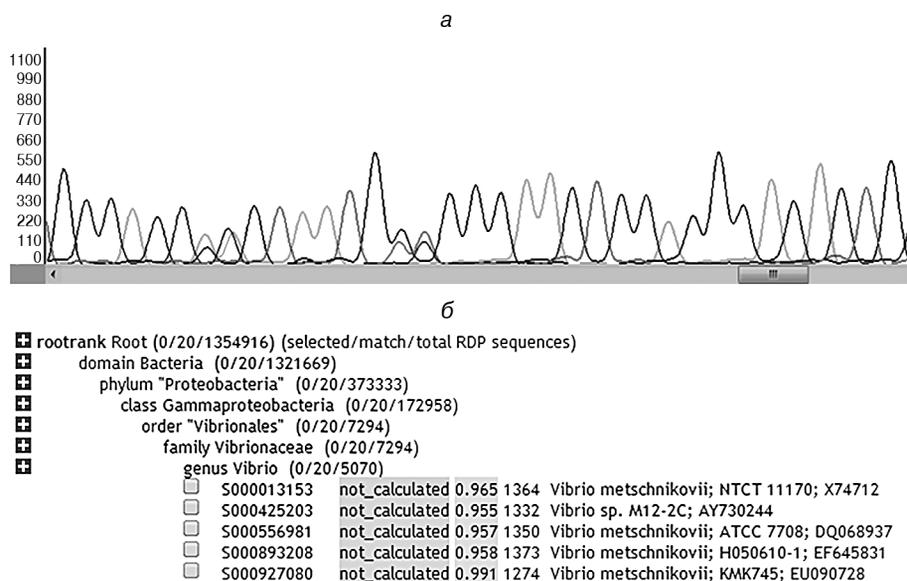


Рис. 1. Идентификация *V. metschnikovii* на основании структуры гена *16S rRNA*: а – фрагмент хроматограммы, полученной при секвенировании гена *16S rRNA* «колонии б»; б – идентификация с использованием проекта RDP *V. metschnikovii* 1-13.

У культур, отнесенных по профилю константных белков к *V. metschnikovii*, при сопоставлении с базой данных GenBank установлена большая вариабельность последовательности гена *16S rRNA* – выявлено от 3 до 7 замен на анализируемом участке гена. При этом следует отметить, что у одной культуры («колония б») обнаружен полиморфизм фрагмента *16S rRNA*, проявляющийся в регистрации на хроматограмме двойных пиков в позициях 1133 (A/G), 1134 (A/C), 1141 (T/G) и 1142 (T/C) гена типового штамма *V. metschnikovii* NCTC 11170 (рис. 1, а). Учитывая интенсивность отдельных пиков на одной из хроматограмм, можно предположить, что доминирующей является аллель с нуклеотидами А, С, G, Т в данных позициях, которая соответствует структуре гена типового штамма *V. metschnikovii* NCTC 11170. Другая аллель, по всей вероятности, содержит нуклеотиды G, С, G, С в вариабельных позициях и полностью соответствует структуре данного участка гена *16S rRNA* другого типового штамма *V. metschnikovii* NBRC 103153 (NR_114220). Факт полиморфизма указанного участка гена подтвержден при повторном поколониальном исследовании ДНК культуры. Эти данные могут свидетельствовать о присутствии в геноме культуры различных копий гена, однако для подтверждения данного предположения требуется проведение дополнительных исследований. Известно, что для некоторых групп микроорганизмов внутригеномная гетерогенность гена *16S rRNA* (наличие разных по структуре копий в геноме) препятствует достоверному определению их таксономического положения [20]. Однако в нашем исследовании при выравнивании нуклеотидных последовательностей гена *16S rRNA* анализируемых культур по алгоритму blastn максимальное сходство установлено с депонированными в GenBank вибри-

онами Мечникова и расчет уровня гомологии позволяет идентифицировать эти культуры как *V. metschnikovii* (идентичность от 99,03 до 99,58%). Отношение к указанному таксону анализируемых культур определено и в RDP (рис. 1, б).

Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *rpoB* всех анализируемых культур *V. cholerae* составил 98,75–100%, *V. fluvialis* – 99,38–99,75%, *V. metschnikovii* – 95,06–100% в сравнении с последовательностями референсных штаммов. Учитывая данные литературы, для установления таксономической принадлежности микроорганизмов по структуре гена *rpoB* необходимый уровень гомологии последовательностей зависит от размера анализируемого фрагмента гена: при размере фрагмента от 300 до 600 п.о. для отнесения к виду гомология с референсным штаммом должна составлять не менее 94–95%, при размере 600–825 п.о. – 96–97% [21]. Отнесение изучаемого микроорганизма к новому виду возможно при идентичности полной нуклеотидной последовательности гена *rpoB* с имеющимися в базах менее 97,7%, к подвиду одного вида – более 98,8% [21].

В соответствии с этими критериями идентификация исследуемых культур *V. cholerae*, *V. fluvialis* по *rpoB* полностью соответствует результатам определения таксономической принадлежности по профилю константных белков микробной клетки с использованием масс-спектрометрии (см. табл. 3). Две культуры, идентифицированные в MALDI-ToF как *V. metschnikovii* соответствуют указанному виду и по гену *rpoB*. В структуре анализируемого участка гена *rpoB* третьей культуры, отнесенной по бактериологическим тестам к *V. metschnikovii*, выявлены 43 однонуклеотидные замены в сравнении с референсным штаммом, 42 из которых локализованы в синонимичных сайтах. Гомология последовательности на уровне 95,06% не позволяет достоверно судить о принадлежности культуры к *V. metschnikovii* по структуре указанного локуса. При этом для данной культуры установлен достаточно низкий индекс совпадения белкового паттерна с референсными спектрами базы MALDI Biotyper при масс-спектрометрической идентификации (SV 1,91). Невозможность достоверной видовой масс-спектрометрической идентификации культуры, отнесенной по бактериологическим тестам и структуре гена *16S rRNA* к *V. metschnikovii*, может быть обусловлена как особенностями ее биологических свойств, так и недостаточным количеством видоспецифических масс-спектров в базе MALDI Biotyper 3,0 (версия содержит масс-спектры

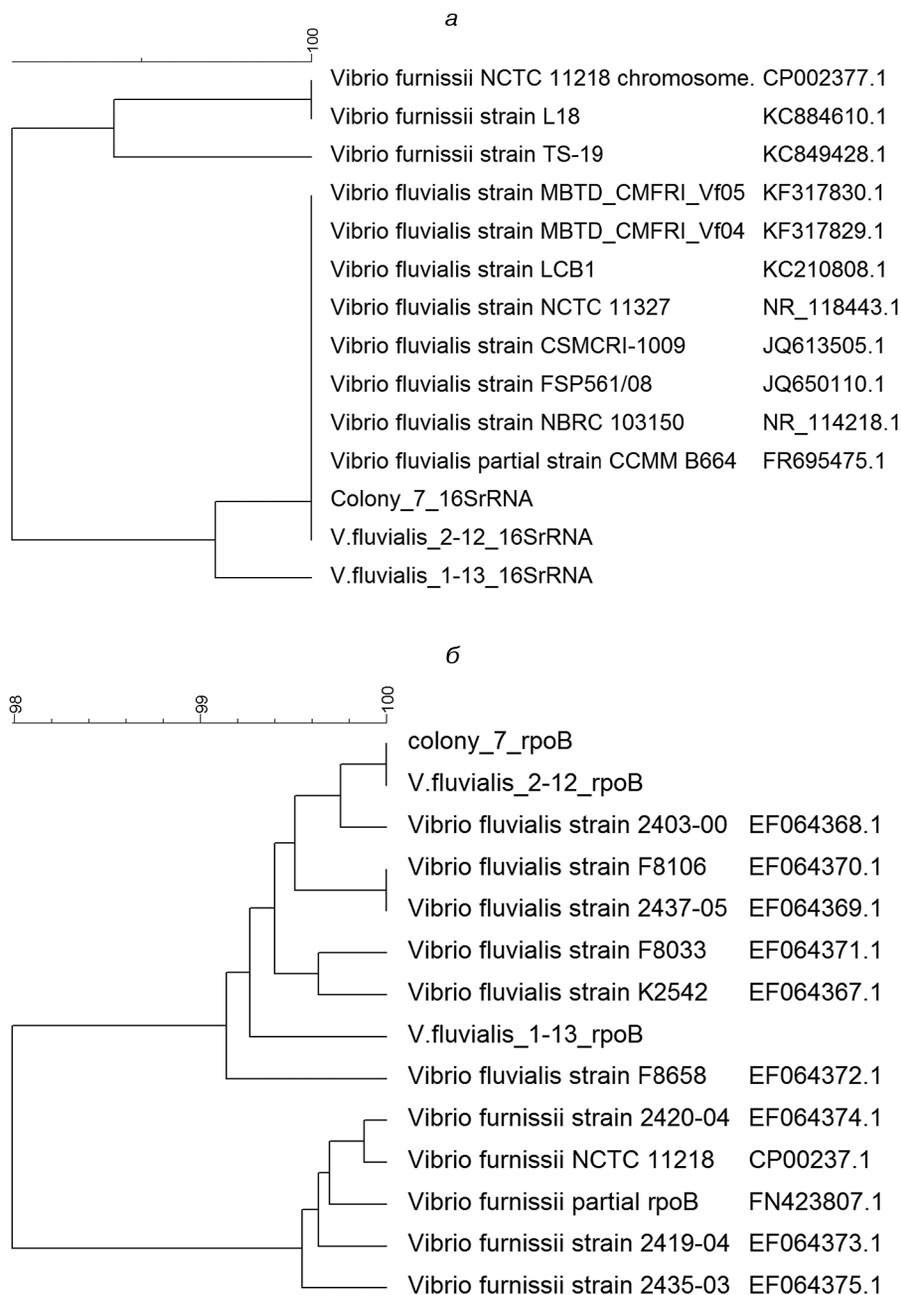


Рис. 2. Дендрограмма, построенная по алгоритму UPGMA на основании сопоставления таксономически информативных генов *V. fluvialis* и *V. furnissii*.
 а – ген *rpoB* (размер анализируемого фрагмента гена 808 п.о.).
 б – ген 16S rRNA (размер анализируемого фрагмента гена 834 п.о.).

двух штаммов *V. metschnikovii* LMG 11664 и V47 IBS). В пользу последнего аргумента свидетельствуют и данные идентификации других культур *V. metschnikovii*, индекс совпадения для которых установлен на уровне ниже достоверной идентификации до рода и вида (см. табл. 3).

Следует отметить, что в ряде научных исследований обозначены проблемы дифференциации по профилю константных белков и структуре генов 16S rRNA, *rpoB* отдельных близкородственных видов рода *Vibrio*. Так, за счет высокого сходства нуклеотидной последовательности 16S rRNA затруд-

нена дифференциация штаммов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* по данному локусу [18, 25]. R. Dieckmann и соавт. [12] указывают на невозможность разделения по масс-спектрометрическим профилям и гену *rpoB* идентифицированных по биохимическим тестам как *V. fluvialis*- и *V. furnissii* штаммов, поскольку известно, что нуклеотидная последовательность гена β -субъединицы РНК-полимеразы у данных видов характеризуется высокой гомологией. Анализируемый в настоящей работе участок гена *rpoB* включает 13 позиций, дифференцирующих типовые штаммы *V. fluvialis* и *V. furnissii*. При этом у всех включенных в исследование культур («колония 5», *V. fluvialis* 2–12, *V. fluvialis* 1–13) в данных позициях идентифицированы нуклеотиды, характерные для *V. fluvialis*. На дендрограмме, построенной по алгоритму UPGMA, исследуемые культуры входят в группу, сформированную штаммами *V. fluvialis* из базы данных GenBank, дистанцированную от группы штаммов *V. furnissii* (рис. 2, а). Дифференциация исследуемых культур и *V. furnissii* установлена и по структуре гена 16S rRNA – на анализируемом участке обнаружено расхождение их последовательностей по двум позициям, что подтверждается и при кластерном анализе группы *V. fluvialis* и *V. furnissii* (рис. 2, б). При этом, как и в случае с другими таксонами, у *V. fluvialis* обнаруживается большая гетерогенность нуклеотидной последовательности гена *rpoB* в сравнении с геном 16S rRNA. Такая же закономерность установлена и

для *V. cholerae*. Кластерный анализ нуклеотидной последовательности гена *rpoB* *V. cholerae* показал 100% идентичность с рефересной (штамм *V. cholerae* N16961) только у взятых в исследование в качестве группы сравнения эпидемически опасного (И-1300) и потенциально эпидемически опасного (И-1501) штаммов O1-серогруппы. Нетоксигенные же *V. cholerae* *eltor* O1-серогруппы и все вибрионы не O1/O139 оказались вариабельны по этому гену и дифференцируются на 5 генотипов с числом вариабельных позиций от 1 до 7 (рис. 3). Основываясь на этих данных, можно предположить наличие ассоци-

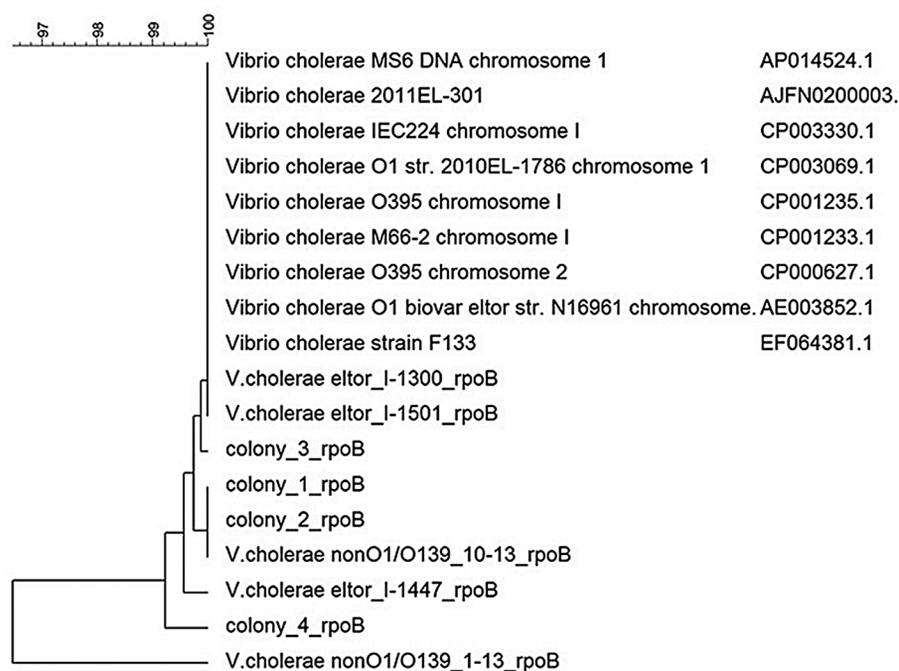


Рис. 3. Дендрограмма, построенная по алгоритму UPGMA на основании сопоставления фрагмента гена *rpoB* *V. cholerae* (размер анализируемого фрагмента гена 800 п.о.).

ации между структурой гена *rpoB* и эпидемической опасностью холерного вибриона. Однако, в работе F. Schirmeister и соавт. [27] идентифицированы изолированные от пациентов нетоксигенные *V. cholerae* не O1/O139, характеризующиеся 100% гомологией нуклеотидной последовательности гена *rpoB* с токсигенными штаммами. Поэтому для уточнения вопроса о взаимосвязи эпидемической опасности и особенностей структурной организации данного генетического локуса необходимо проведение дальнейших исследований.

В целом, анализируя полученные результаты, следует заключить, что установленная масс-спектрометрически принадлежность культур к *V. cholerae* и *V. fluvialis* в 100% случаев подтверждена при геноидентификации на основании структуры генов *16S rRNA* и *rpoB*. Выявленный низкий коэффициент совпадения масс-спектров трех анализируемых культур (определенных как *V. metschnikovii* с вероятной идентификацией до рода) с референсными спектрами базы данных, подтвержденный в одном случае (*V. metschnikovii* 1–13) недостаточным для идентификации уровнем гомологии гена *rpoB*, требует дополнительного изучения данных культур. Для окончательного установления их таксономической принадлежности и решения вопроса о необходимости внесения дополнительных спектров *V. metschnikovii* в базу MALDI Biotyper целесообразны определение полной нуклеотидной последовательности генов *16S rRNA* и *rpoB*, изучение внутригеномной вариативности гена *16S rRNA*, а также привлечение дополнительных методов идентификации этих культур на основании изучения биохимической активности.

Сопоставление же данных протеомной и генетической идентификации с бактериологической свидетельствует о вероятности гиподиагностики на основании фенотипических культуральных тестов, в частности биохимической активности в отношении аминокислот, при мониторинговых исследованиях. Данный факт может быть обусловлен штаммовыми особенностями происходящих в микробной клетке метаболических процессов в различных условиях ее существования (в данном случае в объектах окружающей среды и в условиях *in vitro*) и постепенной адаптацией к культивированию на питательных средах с восстановлением соответствующей роду *Vibrio* биохимической активности.

Установленная высокая диагностическая чувствительность и специфичность масс-спектрометрии при исследовании проб

из объектов окружающей среды определяют целесообразность включения метода в схему микробиологического мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов. При этом применение масс-спектрометрической идентификации возможно на этапе как отбора колоний (при достаточном их количестве), так и их идентификации. С учетом требований биологической безопасности способ подготовки материала для исследования должен определяться после предварительной постановки ориентировочной реакции агглютинации с холерными O1–O139- и RO-сыворотками [16]. В дальнейшем бактериологическая идентификация отнесенных при прямом белковом профилировании к *V. cholerae* не агглютинирующихся холерными сыворотками культур не требуется. Что касается идентифицированных масс-спектрометрически как *V. cholerae* агглютинирующихся культур, то они должны идентифицироваться дополнительно по комплексу бактериологических и молекулярно-генетических тестов для определения их принадлежности к серогруппе, биовару и оценке эпидемической значимости.

Заключение

Результаты комплексного исследования позволяют рассматривать MALDI-ToF масс-спектрометрию как высокоэффективный метод ускоренной идентификации морфологически сходных с микроорганизмами рода *Vibrio* колоний в процессе мониторинга вибриофлоры объектов окружающей среды. Применение MALDI-ToF масс-спектрометрии обеспечивает повышение качества диагностики, сокращение сроков определения таксономической принадлеж-

ности культур, существенное снижение трудозатрат, уменьшение необходимого для анализа количества расходных материалов, реактивов и питательных сред за счет исключения из схемы родовой и видовой идентификации ряда тестов. Вместе с тем следует отметить, что в качестве одного из перспективных направлений исследований с использованием данной технологии рассматривается разработка подходов к внутривидовой дифференциации на основании выявления специфических для определенной серогруппы, биовара, эпидемической значимости пиков масс-спектра идентифицируемых культур, что обеспечит дальнейшее совершенствование и оптимизацию схемы лабораторной диагностики в рамках эпидемиологического надзора за холерой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брико Н.И., Покровский В.И. Глобализация и эпидемический процесс. *Эпидемиол. инфекц. болезни*. 2010; 4: 4–11.
2. Марамонович А.С., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В., Куликалова Е.С. Эволюция эпидемиологии холеры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2006; 6: 63–71.
3. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Арешина О.А., Назаретян А.А., Кругликов В.Д. и др. Характеристика эпидемиологической обстановки в мире (2003–2012 гг.) и прогноз на 2013 г. *Пробл. особо опасных инфекций*. 2013; 1: 11–6.
4. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends in Microbiol.* 2009; 18(1): 46–54.
5. *Weekly epidemiological record*. 2013; 88 (31): 321–36. Available at: <http://www.who.int/wer>.
6. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Мельникова А.А. О мерах по совершенствованию эпидемиологического надзора в части индикации возбудителей инфекционных заболеваний. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2013; 2: 4–13.
7. Шарова И.Н., Казакова Е.С., Портенко С.А., Красовская Т.Ю., Осина Н.А., Куклев В.Е. и др. Совершенствование и стандартизация лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2: 46–8.
8. Sauer S., Freiwald A., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostrzewa M. et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One*. 2008; 3(7): e2843.
9. Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26: 547–603.
10. Fournier P.-E., Drancourt M., Colson P., Rolain J.-M., La Scola B., Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11: 574–85.
11. Hazen T.H., Martinez R.J., Chen Y., Lafon P.C., Garrett N.M., Parsons M.B. et al. Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(21): 6745–56.
12. Dieckmann R., Strauch E., Alter T. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-ToF mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 109: 199–211.
13. Eddabra R., Prévost G., Scheffel J.-M. Rapid discrimination of environmental *Vibrio* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol. Res.* 2012; 167: 226–30.
14. Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Остяк А.С., Басов Е.А., Куликалова Е.С., Хунхеева Ж.Ю. и др. MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ в экспресс-идентификации микроорганизмов рода *Vibrio*. В кн.: *Материалы XI Межгосударственной научно-практической конференции «Совре-*

менные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на ЧС в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера». Саратов; 2012: 160–2.

15. Afanas'ev M., Mironova L., Ostyak A., Basov E., Kulikalova E., Urbanovich L. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) for rapid, easy and reliable *Vibrio cholerae* identification. *23rd ECCMID. 27–30 April 2013*, Berlin, Germany. Available at: http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=163193&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=180&XNMASKEN_ID=900.
16. Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Басов Е.А., Остяк А.С., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В. MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ в ускоренной идентификации микроорганизмов рода *Vibrio*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014; 3: 22–9.
17. Телесманич Н.Р., Чайка И.А., Агафонова В.В., Сеина С.О., Чемисова О.С., Гончаренко Е.В. и др. MALDI масс-спектрометрический анализ в типировании и внутривидовой дифференциации холерных вибрионов на основе создания референс-библиотеки протеомных профилей. В кн.: *Материалы Совещания специалистов Роспотребнадзора «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. 5–6 июня 2013 г. Ростов н/Д: Дониздат; 2013; 26: 143–8.
18. Emami K., Askari V., Ullrich M., Mohinudeen K., Anil A.C., Khandeparker L. et al. Characterization of bacteria in ballast water using maldi-tof mass spectrometry. *PLoS One*. 2012; 7(6): e38515.
19. *Лабораторная диагностика холеры: Методические указания МУК 4.2.2218-07*. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии; Роспотребнадзора; 2007.
20. Janda J.M., Abbott S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (9): 2761–4.
21. Adekambi T., Drancourt M., Raoult D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in Microbiol.* 2008; 17(1): 37–45.
22. Suzuki M.T., Giovannoni S.J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62(2): 625–30.
23. Tarr C.L., Patel J.S., Pühr N.D., Sowers E.G., Bopp C.A., Strockbine N.A. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(1): 134–40.
24. Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J.P., Raoult D. 16S ribosomal dna sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (10): 3623–30.
25. Oberbeckmann S., Wichels A., Maier T., Kostrzewa M., Raffelberg S., Gerdt G. A polyphasic approach for the differentiation of environmental *Vibrio* isolates from temperate waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011; 75: 145–62.
26. Mollet C., Drancourt M., Raoult D. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* 1997; 26 (5): 1005–11.
27. Schirmeister F., Dieckmann R., Bechlers S., Bier N., Faruque S.M., Strauch E. Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 33: 767–78.

REFERENCES

1. Briko N.I., Pokrovskiy V.I. Globalization and the epidemic process. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2010; 4: 4–11. (in Russian)
2. Maramovich A.S., Urbanovich L.Ya., Mironova L.V., Kulikalova E.S. The evolution of the epidemiology of cholera. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2006; 6: 63–71. (in Russian)
3. Moskvitina E.A., Mazrukho A.B., Adamenko O.L., Arëshina O.A., Nazaretyan A.A., Kругликов V.D. et al. Characteristics of the epidemiological situation on cholera the world over. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2013; 1: 11–6. (in Russian)

4. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends in Microbiol.* 2009; 18(1): 46–54.
5. *Weekly epidemiological record.* 2013; 88 (31): 321–336. Available at: <http://www.who.int/wer>.
6. Onishchenko G.G., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Mel'nikova A.A. On measures to improve epidemiological surveillance in the indication of infectious pathogens. *Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2013; 2: 4–13. (in Russian)
7. Sharova I.N., Kazakova E.S., Portenko S.A., Krasovskaya T.Yu., Osina N.A., Kuklev V.E. et al. Improvement and standardization of laboratory diagnostics procedures as concerns particularly dangerous, “emerging”, and “reemerging” infectious diseases. *Problemy jsobo opasnykh infektsiy.* 2013; 2: 46–8. (in Russian)
8. Sauer S., Freiwald A., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostrzewa M. et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One.* 2008; 3(7): e2843.
9. Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. Matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26: 547–603.
10. Fournier P.-E., Drancourt M., Colson P., Rolain J.-M., La Scola B., Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11: 574–85.
11. Hazen T.H., Martinez R.J., Chen Y., Lafon P.C., Garrett N.M., Parsons M.B. et al. Rapid identification of vibrio parahaemolyticus by whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(21): 6745–56.
12. Dieckmann R., Strauch E., Alter T. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-ToF mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 109: 199–211.
13. Eddabra R., Prévost G., Scheftel J.-M. Rapid discrimination of environmental *Vibrio* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol. Res.* 2012; 167: 226–30.
14. Mironova L.V., Afanas'ev M.V., Ostyak A.S., Basov E.A., Kulikalova E.S., Khunkheeva Zh. Yu. et al. MALDI-ToF mass spectrometry for rapid *Vibrio* spp. Identification. In: *Modern Technologies In The Improvement of Preventive Measures And Response To Emergencies In The Area of Public Health Sanitary-Epidemiological nature: Proceedings XI Interstate scientific-practical conference: Saratov, 2012: 160–2.* (in Russian)
15. Afanas'ev M., Mironova L., Ostyak A., Basov E., Kulikalova E., Urbanovich L. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) for rapid, easy and reliable *Vibrio cholerae* identification. *23rd ECCMID. 27–30 April 2013, Berlin, Germany.* Available at: http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=163193&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=180&XNMASKEN_ID=900.
16. Afanas'ev M.V., Mironova L.V., Basov E.A., Ostyak A.S., Kulikalova E.S., Urbanovich L.Ya., Balakhonov S.V. MALDI-ToF mass-spectrometric analysis in the accelerated identification of *Vibrio* genus microorganisms *Molekularnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2014; 3: 22–9. (in Russian)
17. Telesmanich N.R., Chayka I.A., Agafonova V.V., Seina S.O., Chemisova O.S., Goncharenko E.V. et al. MALDI mass spectrometry analysis in typing and intraspecific differentiation of *V. cholerae* based on the creation a reference library of proteomic profiles In: *Cholera and Pathogen for Human Vibrios: Proceedings of the meeting of specialists of Rospotrebnadzor 5–6 June 2013. Rostov n/D: Donizdat; 2013: 26: 143–8.* (in Russian)
18. Emami K., Askari V., Ullrich M., Mohinudeen K., Anil A.C., Khandeparker L. et al. Characterization of bacteria in ballast water using maldi-tof mass spectrometry. *PLoS One.* 2012; 7(6): e38515.
19. *Laboratory diagnosis of cholera: methodical instructions. MI 4.2.2218–07.* Moscow: Federal Center of hygiene and epidemiology, 2007. (in Russian).
20. Janda J.M., Abbott S.L. 16S rRNA Gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (9): 2761–64.
21. Adekambi T., Drancourt M., Raoult D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in Microbiol.* 2008; 17(1): 37–45.
22. Suzuki M.T., Giovannoni S.J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62(2): 625–30.
23. Tarr C.L., Patel J.S., Puhr N.D., Sowers E.G., Bopp C.A., Strockbine N.A. Identification of *vibrio* isolates by a multiplex pcr assay and rpoB sequence determination. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(1): 134–40.
24. Drancourt M., Bollet C., Carlouz A., Martelin R., Gayral J.P., Raoult D. 16S ribosomal dna sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (10): 3623–30.
25. Oberbeckmann S., Wichels A., Maier T., Kostrzewa M., Raffelberg S., Gerds G. A polyphasic approach for the differentiation of environmental *Vibrio* isolates from temperate waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011; 75: 145–62.
26. Mollet C., Drancourt M., Raoult D. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* 1997; 26 (5): 1005–11.
27. Schirmeister F., Dieckmann R., Bechlars S., Bier N., Faruque S.M., Strauch E. Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 33: 767–78.

Поступила 28.08.14

Received 28.08.14

Сведения об авторах:

Басов Евгений Александрович, врач-бактериолог лаборатории холеры; **Афанасьев Максим Владимирович**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела эпидемиологии; **Хунхеева Жанна Юрьевна**, врач-бактериолог лаборатории холеры; **Миткеева Светлана Карловна**, лаборант-исследователь лаб. холеры; **Ганин Владислав Степанович**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории холеры; **Урбанович Людмила Яковлевна**, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. холеры; **Куликалова Елена Станиславовна**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории холеры; **Гольдапель Эдуард Геннадьевич**, врач-бактериолог лаборатории холеры; **Балахонov Сергей Владимирович**, доктор мед. наук, проф., директор института.