

DOI 10.21055/0370-1069-2021-3-40-50

УДК 579.61:616-078

Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, И.В. Кузнецова, О.В. Бобрышева, Т.Л. Красовская, А.Н. Куличенко

ПРОГРАММНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация*

Эффективность дифференциации бактериальных патогенов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии зависит от качества проведения пробоподготовки, соблюдения параметров анализа и от используемых статистических подходов, реализованных различными современными программными средствами. В обзоре дана краткая характеристика наиболее известного программного обеспечения, используемого при обработке и биоинформационном анализе данных времяпролетной масс-спектрометрии. Представлен перечень компьютерных платформ, программ и сред как коммерческих, так и находящихся в общем доступе. Приведены результаты индикации и идентификации возбудителей особо опасных и природно-очаговых инфекций методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с помощью общедоступного программного обеспечения – язык программирования R, Mass-Up, Microbe MS, лицензированного – MatLab, ClinProTools, а также бесплатных веб-приложений, в том числе SpecClust, Ribopeaks. Представлена информация об опыте использования таких известных платформ, как MALDI BioTyper, SARAMIS Vitek-MS и Andromas, для меж- и внутривидовой дифференциации штаммов близкородственных видов патогенных микроорганизмов. Приведены результаты идентификации и дифференциации микроорганизмов методом MALDI-TOF MS на основании выявления специфических белков для перекрестного сравнения – биомаркеров. Показано, что среда языка программирования R представляет собой одну из общедоступных универсальных платформ с оптимальным сочетанием алгоритмов обработки и интерпретации большого массива масс-спектрометрических данных.

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

Корреспондирующий автор: Ульшина Диана Васильевна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Кузнецова И.В., Бобрышева О.В., Красовская Т.Л., Куличенко А.Н. Программные решения для индикации и идентификации патогенных микроорганизмов методом времяпролетной масс-спектрометрии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:40–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-40-50.

Поступила 13.10.2020. Отправлена на доработку 15.05.2021. Принята к публ. 15.06.2021.

D.V. Ul'shina, D.A. Kovalev, I.V. Kuznetsova, O.V. Bobrysheva, T.L. Krasovskaya, A.N. Kulichenko

SOFTWARE SOLUTIONS FOR INDICATION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS USING TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY*Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation*

Abstract. The effectiveness of differentiation of bacterial pathogens using MALDI-TOF mass spectrometry depends on the quality of sample preparation, compliance with mass spectrometric analysis parameters and statistical approaches used, implemented by various modern software tools. The review provides a brief description of the most known software used in the processing and bioinformation analysis of time-of-flight mass spectrometry data. A list of computer platforms, programs and environments, both commercial and publicly available, is presented. The results of indication and identification of pathogens of particularly dangerous and natural-focal infections by MALDI-TOF mass spectrometry using publicly available software – programming language R, Mass-Up, MicrobeMS, licensed – MatLab, ClinProTools, as well as free web applications, including, SpecClust, Ribopeaks are provided. The data on usage of such well-known platforms as MALDI BioTyper, SARAMIS Vitek-MS and Andromas (Andromas SAS, France) for inter- and intra-specific differentiation of closely related species are presented. Results of identification and differentiation of microorganisms applying MALDI-TOF mass spectrometry based on detection of specific proteins for cross-comparison – biomarkers – are given. The analysis shows that the programming language R environment is one of the publicly available universal platforms with an optimal combination of algorithms for processing and interpreting of a large array of mass spectrometric data.

Key words: MALDI-TOF MS, protein profiling, indication, identification.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Diana V. Ul'shina, e-mail: stavnipchi@mail.ru

Citation: Ul'shina D.V., Kovalev D.A., Kuznetsova I.V., Bobrysheva O.V., Krasovskaya T.L., Kulichenko A.N. Software Solutions for Indication and Identification of Pathogenic Microorganisms Using Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:40–50. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-40-50.

Received 13.10.2020. Revised 15.05.2021. Accepted 15.06.2021.

Ul'shina D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Kovalev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Kuznetsova I.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9513-0761>

Bobrysheva O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6338-4476>

Kulichenko A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

В настоящее время наравне с классическими методами индикации и идентификации микроорганизмов все чаще применяются молекулярно-биологические, к которым принято относить метод исследования белковых профилей – времяпролетную масс-спектрометрию с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Ее можно рассматривать в качестве альтернативы комплексу традиционных методов идентификации микроорганизмов, в частности бактериологическому, иммунологическому, молекулярно-генетическому (метод полимеразной цепной реакции) [1]. Опубликованы результаты эффективного применения метода MALDI-TOF MS для индикации, идентификации возбудителя чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, микроорганизмов рода *Vibrio* и др. [2–4].

Детекцию патогенных микроорганизмов методом MALDI-TOF MS, как правило, осуществляют на основании выявления на масс-спектрах пиков, характерных для основных рибосомных белков в диапазоне масс от 1000 до 20000 Да [5–9], метод экстракции которых ацетонитрилом и муравьиной кислотой после предварительной обработки 70 % этанолом зарекомендовал себя как эффективный способ пробоподготовки для широкого круга микроорганизмов, обеспечивая образование достаточного количества изолированных спектральных пиков при низкой интенсивности шумовых сигналов [10–13].

Рибосомные белки как объект исследования MALDI-TOF MS. Общеизвестно, что большинство отдельных сигналов на масс-спектрах соответствует рибосомным белкам (РБ), которые обладают средней гидрофобностью и кодируются более чем 50 генами, рассеянными в основном в хромосомных локусах [10]. РБ большей частью представлены наиболее распространенными цитозольными белками, количество которых в клетках микроорганизма не зависит от стадии жизнедеятельности или условий роста [14]. Диапазон масс для РБ колеблется в пределах от 4 до 30 кДа, что определяет возможность их использования в качестве надежных биомаркеров для рутинной идентификации микроорганизмов методом MALDI-TOF MS.

Метод MALDI-TOF MS позволяет осуществлять достоверную дифференциацию бактериальных патогенов на основании выявления на масс-спектрах биомаркеров посредством комплекса статистических подходов, которые реализованы различными современными программными средствами.

Цель обзора – охарактеризовать наиболее известные в настоящее время биоинформационные подходы, используемые для индикации и идентификации патогенных микроорганизмов методом MALDI-TOF MS, реализованные в различном программном обеспечении (ПО).

Для корректной интерпретации полученных данных необходимо специализированное ПО, способное устранить погрешности визуального анализа спектров. Обработка исходных данных – необходимая

процедура, позволяющая дифференцировать аналитически значимые сигналы от шума. Выполнение основных этапов данной процедуры в сочетании с алгоритмами биоинформационного анализа определяет успех при решении конкретной научной задачи.

ПО, используемое для интерпретации данных MALDI-TOF MS. Востребовано и общедоступное ПО, например, язык программирования R, Mass-Up, MicrobeMS, и лицензированное (MatLab, ClinProTools), и бесплатные веб-приложения, в том числе SpecClust, Ribopeaks.

ClinProTools (Bruker Daltonics, Германия) – коммерческое ПО для быстрого и точного выявления биомаркеров в многокомпонентных бактериальных смесях. ClinProTools сочетает многочисленные комбинации вариантов визуализации и функции статистического анализа, в частности метод опорных векторов (Supported Vector Machine), искусственную нейронную сеть (Supervised Neural Network), комплексное использование которых позволяет проводить классификационное или прогностическое моделирование, например, оценивать значимость белковых маркеров в качестве предикторов рецидива и тяжести заболевания. Относительно высокая стоимость ClinProTools выступает в качестве ограничивающего фактора для использования данного ПО.

S.Y. Hsieh *et al.* (2008) провели исследование по определению чувствительности метода MALDI-TOF MS для идентификации изолятов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* в пробах клинического материала с использованием ClinProTools [15]. В ходе эксперимента определено минимальное количество бактериальных клеток в пробе, необходимое для достоверной идентификации патогенов, в частности для *E. coli* оно составило $5,8 \cdot 10^3$ м.к./мл и $5,5 \cdot 10^3$ м.к./мл – для *S. aureus*. При работе с бактериальными смесями, включающими штаммы разных видов, минимальная концентрация составила $3 \cdot 10^4$ м.к./мл. При указанной концентрации достоверно выявлено присутствие белковых биомаркеров для каждого из микроорганизмов: *E. coli* (4532, 5097, 9069 Да) и *S. aureus* (3038, 5529 Да). Следует отметить, что указанные концентрации, характеризующие чувствительность метода MALDI-TOF MS, при выявлении других микроорганизмов могут не соответствовать описанным величинам. По-видимому, минимальное количество бактериальных клеток в пробе, к примеру, для внутриклеточных возбудителей, может возрасти на несколько порядков.

M.L. Faron *et al.* (2017) опубликовали результаты исследования белковых профилей экстрактов гемокультур шести видов микроорганизмов без какой-либо дополнительной экстракции с применением ClinProTools [16]. Обработку полученных спектров проводили с использованием Genetic Algorithm: классификатора (Quick Classifier), метода опорных векторов (Support Vector Machine). На основании выявления групп уникальных биомаркеров достоверно идентифицировали 57 изолятов 6 видов

бактерий (*S. aureus*, *Streptococcus* serogroup B, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serogroup B, *Pseudomonas aeruginosa*). Достоверность подтверждали методом перекрестной проверки (за критический уровень статистической значимости принимался p -критерий $\leq 0,05$). Экспериментально установили, что для достоверной идентификации каждого вида бактерий необходимо и достаточно присутствие на масс-спектрах шести биомаркеров.

Известно, что индикация и дифференциация *Bacillus anthracis* от близкородственных бацилл затруднена высокой степенью их родства. С целью улучшения качества внутривидовой дифференциации штаммов *B. anthracis* и *B. cereus* методом MALDI-TOF MS была разработана модель машинного обучения на основе алгоритма Genetic Algorithm ПО ClinProTools, что привело к значительному росту чувствительности (100 %) и специфичности (100 %) анализа. В качестве основы используемой модели выбрали десять биомаркеров, позволяющих правильно идентифицировать изоляты возбудителя сибирской язвы от остальных представителей группы *B. cereus* [17].

Показано, что проведение биоинформационного анализа масс-спектрометрических данных с помощью алгоритма Genetic Algorithm ПО ClinProTools позволяет успешно дифференцировать 12 видов *Yersinia* spp. Кроме того, разработана и успешно апробирована модель машинного обучения, позволяющая проводить дифференциацию изолятов *Yersinia pestis* в зависимости от принадлежности к биоварам *Antiqua*, *Medievalis* и *Orientalis* [18].

Идентификация патогенных штаммов *Leptospira* spp. с помощью масс-спектрометрического анализа затруднительна из-за отсутствия эталонных масс-спектров в коммерческих таксономических базах. Представленные в литературе данные свидетельствуют об эффективном использовании метода MALDI-TOF MS на основе локальных баз данных в комплексе с биоинформационными подходами [19]. По данным авторов, для установления специфичных биомаркеров, позволяющих достоверно (99,2 %) дифференцировать штаммы видов *Leptospira interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, наиболее эффективно использовать алгоритм Genetic Algorithm. Кроме того, применение этого алгоритма позволило выявить группы биомаркеров, используемые для серотипирования патогенных лептоспир с точностью 98,1 %.

Высокая прогностическая способность модели машинного обучения, основанной на алгоритме Genetic Algorithm, позволила правильно (100 %) дифференцировать штаммы *Leptospira* spp. в зависимости от принадлежности к сероварам *Sejroe*, *Ballum*, *Tarassovi*, *Copenhageni*, *Mozdoc*, *Grippotyphosa* и *Patoc* [20]. Специфичные сигналы на масс-спектрах этого возбудителя были воспроизводимо обнаружены с помощью указанного биоинформационного анализа также для сероваров *Saxkoebing*, *Pomona*, *Australis*, *Icterohaemorrhagiae* и *Grippotyphosa* [21].

Очевидно, что возможность использования совокупности биомаркеров для дифференциации разных видов бактерий делает перспективным применение этого подхода для межвидового типирования. Анализ всего белкового профиля, учитывающего присутствие всех сигналов, может способствовать установлению родства отдельных изолятов, что существенно расширяет возможности в области интерпретации данных.

Таким образом, опыт успешного использования времяпролетной масс-спектрометрии за последнее десятилетие подтверждает достоверность результатов идентификации бактерий до рода, вида и в некоторых случаях до штамма на основании выявления уникальных белков, специфичных для конкретного патогена.

FLOSS (Free/Libre and Open Source Software) – ПО, находящееся в общем доступе.

Ribopeaks – веб-ресурс для определения таксономического положения бактерий на основе сравнительного анализа результатов масс-спектрометрического исследования и репозитория Ribopeaks Database и Genbank. Результат анализа представляет собой график, ось абсцисс которого содержит значения m/z для каждого пика, ось ординат – частоту регистрации каждого пика. Рибосомным белкам, выявленным при идентификации исследуемого микроорганизма, присваиваются аббревиатуры L и S, относящиеся к большой или малой единице рибосомы соответственно. Веб-ресурс, использующий алгоритмы машинного обучения, позволяет проводить таксономическую классификацию на уровне рода, вида и штамма микроорганизма [22].

К достоинствам веб-приложений, на примере *Speclust* (Lund University, Швеция), можно отнести удобный интерфейс, возможность загрузки неограниченного количества исходных данных, что особенно важно при наличии большого количества реплик для каждого образца. Кроме того, в арсенал приложения включена опция по выявлению гомологичных сигналов для разных спектров, учитывая ошибки по величине m/z до нескольких Да, присутствие которых на масс-спектрах может быть обусловлено влиянием аппаратного дрейфа при регистрации ионов в среде вакуума. К недостаткам можно отнести полное отсутствие для оператора возможности участвовать в выборе алгоритма, используемого для анализа данных.

Использование приложения *Speclust* в ходе сравнительного анализа белковых профилей 38 бактериальных изолятов *Streptococcus* spp. позволило провести дифференциацию видов и подвидов: *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. canis*, *S. parauberis*, *S. salivarius*, *S. equinus* и *S. gallolyticus*. Кроме того, установили специфичные для представителей рода *Streptococcus* сигналы (2112, 4452 и 5955 Да) [23].

В публикации R. El-Jeni *et al.* (2019) описан пример эффективного применения *Speclust* для

кластерного анализа белковых профилей штаммов *Leuconostoc* spp., это позволило провести дифференциацию представителей вида *Leuconostoc pseudomesenteroides*, а также выявить положительную корреляционную связь данных с результатами, полученными с использованием метода 16S рПНК [24].

ПО *Mass-Up* (Biomedical Research Center, Испания) сочетает алгоритмы машинного обучения (Machine Learning), реализованные с помощью языка Java, и платформы с открытым исходным кодом для обработки и анализа данных MALDI-TOF MS. Данное ПО позволяет проводить предварительную обработку исходных данных посредством интегрированных функций двух пакетов языка программирования R (MALDIquant и MassSpecWavelet), выполнять различные виды анализов (например, обнаружение биомаркеров, кластеризацию, бикластеризацию и т.д.). Построение дендрограмм проводится с помощью алгоритмов агломеративной (объединительной) иерархической кластеризации, реализованных с использованием адаптированной версии JTreeView (<http://jtreeview.sourceforge.net>). Для построения 3D-визуализации на основе результата классификации данных методом главных компонент (PCA) используется библиотека Java с открытым исходным кодом Jzy3d (<http://www.jzy3d.org/>). К достоинствам *Mass-Up* можно отнести открытый доступ, удобный пользовательский интерфейс в сочетании с арсеналом эффективных инструментов интерпретации MALDI-TOF MS данных и то, что ПО не требует от пользователя навыков программирования.

В качестве примера эффективного применения ПО *Mass-Up* можно привести опубликованные результаты исследований Y. Torres-Corral *et al.* (2019) [25]. Согласно данным для микроорганизмов рода *Streptococcus* выявлен единственный биомаркер с массой в 4451,6 Да, который соответствовал белку L-36 (большая субчастица 50S). Остальные группы биомаркеров определили как видоспецифичные и предположительно отнесли к рибосомным субъединичным белкам и гистонам. В сравнении с этим анализ в программе MALDI BioTyper (Bruker Daltonics, Германия) позволил идентифицировать на уровне вида только 40 % от общей выборки штаммов *Streptococcus parauberis* и *S. iniae*. Остальные протестированные штаммы идентифицировали только на уровне рода.

Результаты исследования патогенных микроорганизмов с использованием ПО *Mass-Up* описаны в статье S. Christoforidou *et al.* [26]. В ходе работы идентифицировали до рода и вида 75 (100 %) изолятов возбудителя бруцеллеза. Для 47 (75,81 %) из 62 штаммов *Brucella melitensis* правильно установили принадлежность к третьему биовару. Кроме того, на основании данных MALDI-TOF MS выявили биомаркеры, позволяющие дискриминировать вакцинный штамм *B. melitensis* Rev. 1 от остальных представителей *Brucella* spp.

Характеристики биомаркеров, позволяющих

проводить определение серовара, а также обнаружение фрагментов генов островов патогенности для бактерий рода *Legionella*, с использованием платформы *Mass-Up* изложены в работе M.A. Kyritsi *et al.* [27]. Так, для 115 из 132 штаммов *Legionella pneumophila* выявили 5 биомаркеров, определяющих принадлежность к серовару с чувствительностью – 87,5 %, специфичностью – 86,7 % и точностью – 87,1 %. Установление фрагмента гена острова патогенности *rtxA* *L. pneumophila* проводили на основании присутствия двух биомаркеров (чувствительность – 100 %, специфичность – 76,5 % и точность – 97,4 %). Для обнаружения фрагмента гена острова патогенности *lvhL* *pneumophila* использовали один биомаркер с получением следующих характеристик: чувствительность – 82,5 %, специфичность – 100 % и точность – 84,1 %.

Дифференцирующая способность метода MALDI-TOF MS при диагностике энтеровирусного менингита изучена в работе I. Torres *et al.* (2018) [28]. С помощью ПО *Mass-Up* выявили 30 биомаркеров, позволяющих правильно дифференцировать 91 % отрицательных от 90 % положительных проб спинномозговой жидкости. По мнению авторов, метод MALDI-TOF MS может быть успешно использован в качестве экспресс-метода при диагностике энтеровирусного менингита.

ПО *MicrobeMS* – программный пакет, который распространяется бесплатно, позволяет загружать данные не только в оригинальном формате, определенном Bruker Daltonics, но также включает функцию импорта, обработки и преобразования данных в формате MatLab. Доступны стандартные манипуляции по обработке данных: сглаживание, коррекция базовой линии, нормализация, обнаружение пиков и другие функции. Количество загружаемых данных при использовании ПО ограничено лишь объемом доступной памяти. Наличие закрытого исходного кода в программе не требует от пользователя навыков программирования и позволяет проводить широкий спектр преобразований данных, формировать электронные базы масс-спектров с достаточно ограниченным комплексом возможностей для графического представления полученного результата. Среди широкого перечня доступных функций статистического анализа данных следует отметить возможность скрининга биомаркеров в ансамблях масс-спектров, проявляющих определенную степень сходства. Результат выводится в формате таблицы с перечнем маркеров, каждому значению *m/z* которых соответствуют достоверно рассчитанные абсолютные и относительные значения частоты встречаемости.

ПО *MatLab* – язык программирования/интерактивная среда для вычислительных расчетов, визуализации и программирования. ПО содержит обширную библиотеку математических функций для различного рода статистических расчетов и встроенные инструменты для создания пользовательских графиков

функций. Позволяет осуществлять взаимодействие с языками программирования и библиотеками (C, C++, Java, Python и FORTRAN), анализ данных, разработку алгоритмов, создание моделей и приложений с графическими интерфейсами. ПО MatLab предназначено для решения широкого спектра научных задач любой сложности. Основным ограничением для активного использования этого коммерческого ПО является относительно высокая стоимость.

Результаты дифференциации представителей рода *Burkholderia* методом времяпролетной масс-спектрометрии опубликованы P. Martina *et al.* (2018) [29]. Анализ изолятов 18 видов *Burkholderia* spp. с помощью коммерческой системы MALDI BioTyper показал высокое сходство масс-спектров белковых экстрактов для микроорганизмов этого рода (score – 2,38–2,41). Использование программного пакета MicrobeMS на основе ПО MatLab позволило дифференцировать 62 штамма 18 видов *Burkholderia* spp. на отдельные группы, в частности *Burkholderia pyrocinia*, *B. cenocepacia*, *B. stableis*, *B. gladioli* и др.

Выявление фенотипов и маркеров антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов методом белкового профилирования – актуальное направление в области клинической микробиологии. С помощью ПО MicrobeMS, MatLab и данных библиотеки UniProtKB/Swiss-Prot C. Blumenscheit *et al.* (2020) определили детерминанты устойчивости к противомикробным препаратам и провели идентификацию 29 изолятов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter hormaechei*, *Salmonella* spp. [30]. Выявили 11 детерминант антибиотикорезистентности, представленных 13 изоморфными белками, что позволяет говорить о высокой эффективности метода: чувствительность – 96 % (по отношению к ванкомицину) и специфичность – 100 %.

Положительную корреляционную связь результатов масс-спектрометрического исследования и методов молекулярного типирования установили R. Dieckmann *et al.* (2016) при изучении *Klebsiella oxytoca* [31]. Использование для интерпретации масс-спектров ПО MALDI BioType подтвердило высокое сходство масс-спектров для бактерий этого вида (score – 2,2). Только результаты кластерного анализа, полученные с помощью ПО MicrobeMS, позволили выявить внутривидовое разнообразие штаммов *K. oxytoca*. Обнаруженные белки L25 и S15 с массой 10095 и 10677 Да соответственно, специфичные для исследуемой группы изолятов *K. oxytoca*, по мнению авторов, могут быть использованы как биомаркеры при сравнении с остальными представителями *Klebsiella* spp., что подтверждает высокую дифференцирующую способность метода MALDI-TOF MS.

Среда языка программирования R относится к широко используемым инструментам анализа экспериментальных данных и клинических наблюдений. Термин «среда» предназначен для того, чтобы охарактеризовать R как единую полноценную систему, которая содержит алгоритмы интерактивного анализа

данных и в которой реализованы разнообразные классические и современные статистические подходы. Некоторые из них встроены в базу и представляют собой основу среды языка программирования R, но многие представлены в виде пакетов. Существует около 25 пакетов, загружаемых при установке данного ПО (так называемые стандартные и рекомендуемые), и множество дополнительных ресурсов, распространяемых через репозитории Bioconductor и другие доступные интернет-сайты семейства CRAN (<https://CRAN.R-project.org>), а также личные веб-сайты.

В открытом доступе находится более сотни пакетов с открытым исходным кодом для масс-спектрометрического анализа, в частности, пакет MALDIquant, позволяющий осуществлять полноценную обработку, количественный и качественный анализ данных. Все пакеты доступны на веб-сайтах разработчиков и по следующим ссылкам: CRAN (<http://cran.r-project.org>), Bioconductor (<http://bioconductor.org/packages/release/BiocViews.html#MassSpectrometry>).

В статье A. Daumas *et al.* (2018) приведены результаты эксперимента по выявлению маркеров *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в пробах крови здоровых и больных сепсисом людей с использованием среды языка программирования R [32]. Установлено 10 пиков, общих для всех образцов отрицательного контроля, и 18 сигналов, ассоциированных с протеканием воспалительных процессов. По мнению авторов, метод MALDI-TOF MS позволяет воспроизводимо и точно выявлять маркеры, ассоциированные с протеканием бактериальной инфекции, в пробах крови больных людей, что можно успешно использовать при лабораторной диагностике болезни.

Времяпролетная масс-спектрометрия также используется для сравнения полученных белковых профилей с базой данных референсных масс-спектров. Для этого спектры белковых экстрактов бактериальных культур в режиме онлайн сопоставляются с референсными спектрами базы данных, предоставляемой производителем, или с in-house библиотекой, созданной пользователем, что позволяет за короткое время с высокой точностью выявить и идентифицировать возбудителей многих бактериальных инфекций. В настоящее время индикация, идентификация бактерий, вирусов и грибов методом MALDI-TOF MS проводится с использованием таких известных платформ, как MALDI BioTyper (Bruker Daltonics, Германия), SARAMIS Vitek-MS (Biomerieux, Франция) и Andromas (Andromas SAS, Франция). Качество эталонных масс-спектров и гетерогенность коллекции штаммов в базе данных определяют успешность проведения идентификации близкородственных микроорганизмов, которые характеризуются высокой степенью сходства белковых профилей. Основным недостатком этого подхода является отсутствие в открытом доступе баз данных масс-спектров возбудителей I–II групп патогенности [33].

W.C. Cheng *et al.* (2015) исследовали эффективность системы MALDI BioTyper для достоверной идентификации 56 штаммов *Vibrio* spp., выделенных от пациентов с подтвержденными бактериальными инфекциями кровотока [34]. Идентичность изолятов подтверждена с помощью молекулярно-генетических методов исследования путем секвенирования участков гена *rpoB* и *16S* рПНК. На первом этапе все штаммы, не относящиеся к *Vibrio cholerae*, были правильно идентифицированы до уровня вида, за исключением представителей *V. cholerae* серогрупп O1 и O139. Обновление базы данных масс-спектрами штаммов вида *V. cholerae*, которые не включены в исходную версию используемой базы данных, позволило правильно идентифицировать все изоляты *V. cholerae*.

Параллельно J. Rychert *et al.* (2015) оценили результаты идентификации микроорганизмов *V. cholerae*, используя платформу SARAMIS Vitek-MS. Следует отметить, что все штаммы *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 были правильно идентифицированы до уровня вида; что касается остальных представителей *Vibrio* spp., корректная идентификация получена только для 78 % штаммов [35].

Оценка эффективности использования MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа для определения таксономической принадлежности культур патогенных микроорганизмов при оперативном эпидемиологическом анализе и ретроспективном исследовании коллекционных изолятов проведена С.В. Балахоновым с соавт. (2016). Экспериментально подтверждена высокая информативность видовой идентификации патогенов (104 штамма *Y. pestis*, 92 – *V. cholerae* и 97 – *Francisella tularensis*) на основании масс-спектров рибосомных белков микробной клетки с использованием расширенной базы данных MALDI BioTyper [36].

Л.В. Мироновой с соавт. (2014) проведено комплексное определение масс-спектрометрическим и бактериологическим методами таксономической принадлежности 583 морфологически сходных с холерным вибрионом колоний в пробах из объектов окружающей среды Иркутска. Для этого использовали базу данных MALDI BioTyper в комплексе с in-house библиотекой, которая включала референсные спектры штаммов *V. cholerae*. Результаты идентификации микроорганизмов рода *Vibrio* на основании анализа структуры генов *16SrRNA* и *rpoB* показали высокую диагностическую чувствительность (100 %) и специфичность (85,4 %) метода MALDI-TOF MS, что, по мнению авторов, обуславливает целесообразность включения его в схему микробиологического исследования при мониторинге вибриофлоры поверхностных водоемов [37].

Оценка возможности использования масс-спектрометрического анализа для меж- и внутривидовой дифференциации возбудителя чумы от других представителей рода *Yersinia* проведена М.В. Афанасьевым с соавт. [38]. С помощью базы

данных MALDI BioTyper дифференцировали штаммы *Y. pestis* подвида *pestis* от подвида *altaica*. Отмечена 100 % положительная корреляция результатов масс-спектрометрической идентификации и классического культурального метода. Эффективность применения MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа для меж- и внутривидовой дифференциации изолятов *Y. pestis*, по мнению авторов, обуславливает возможность рассматривать этот метод как весьма перспективный для лабораторной диагностики возбудителя чумы.

Другой группой исследователей проведена дифференциация 11 штаммов *Y. pestis* от таксономически близкородственных видов, в том числе 32 штаммов *Yersinia enterocolitica*, 18 штаммов *Y. pseudotuberculosis* с помощью ресурсов платформы SARAMIS Vitek-MS и среды языка программирования R [39]. М. Wittwer *et al.* (2011) экспериментально определили, что для правильной дифференциации изолятов *Y. pestis* от представителей *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* необходимо и достаточно присутствие на масс-спектрах исследуемых штаммов 15 биомаркеров. Эффективность разработанного протокола MS анализа возбудителя чумы подтверждена результатами корректной идентификации штаммов *Y. pestis*, выращенных в различных условиях культивирования.

Противоположные результаты анализа штаммов *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* с использованием системы MALDI BioTyper описаны в работе L.O. Rouffaer *et al.* (2017). Поиск биомаркеров, позволяющих дифференцировать штаммы чумы, относящиеся к разным биотипам, проводили в среде языка программирования R. В ходе работы авторы выявили следующие трудности. Во-первых, корректные результаты идентификации и дифференциации получены только для штаммов *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, для остальных представителей рода *Yersinia* было определено низкое сходство белковых профилей (score – до 1,7). Во-вторых, биомаркеров, позволяющих проводить дифференциацию штаммов чумы относительно принадлежности к разным биотипам, на полученных масс-спектрах не выявлено. Низкие значения score, по мнению авторов, связаны с отсутствием масс-спектров этих видов в базе данных MALDI BioTyper [40].

Описаны результаты идентификации филогенетически наиболее близких друг другу (близкородственных) видов микроорганизмов методом MALDI-TOF MS с помощью модели машинного обучения и среды языка программирования R [41]. Способность модели машинного обучения правильно идентифицировать штаммы видов *Staphylococcus capitis*, *S. epidermidis*, *S. hemolyticus*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri* вне зависимости от питательной среды и фазы роста исследуемой культуры подтверждали следующими характеристиками: чувствительность – 100 %, специфичность – 97,8 %, точность – 98,5 %

Проведен сравнительный анализ результатов идентификации изолятов *Klebsiella* spp., *Enterobacter cloacae*, *Listeria* spp., *Burkholderia cepacia*, *Bordetella* spp., *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus viridans* с использованием платформ MALDI BioTyper, SARAMIS Vitek-MS и базы данных RAPMID (Mabritec AG, Швейцария), представляющей собой библиотеку молекулярных масс рибосомных белков, рассчитанных на основе частичных или полных последовательностей бактериальных геномов [42]. Поиск биомаркеров, позволяющих проводить меж- и внутривидовую дифференциацию штаммов, осуществляли в среде языка программирования R с использованием пакета ggpubr. Высокой воспроизводимостью (100 %) обладали биомаркеры, специфичные для штаммов видов *Enterobacter cloacae*, *Burkholderia cepacia* и *Streptococcus viridans*. При идентификации штаммов *Staphylococcus aureus*, *S. argenteus* и *S. schweitzeri* с помощью MALDI BioTyper правильно идентифицировано 94,4 % штаммов, тогда как при использовании системы SARAMIS Vitek-MS – только 30,6 %. Полученные результаты авторы объяснили тем, что в базе данных MALDI BioTyper содержались масс-спектры только трех видов (*S. aureus*, *S. argenteus* и *S. schweitzeri*), тогда как в базе данных SARAMIS Vitek-MS были представлены белковые профили только для *S. aureus*. К тому же получение score >2 сразу для нескольких штаммов близкородственных видов микроорганизмов, по мнению авторов, значительно затрудняет интерпретацию результатов идентификации с помощью платформы MALDI BioTyper.

Подтверждение эффективности систем MALDI BioTyper и Andromas представлено в ходе масс-спектрометрического анализа 88 и 29 изолятов *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* [43]. При использовании MALDI BioTyper правильно идентифицировали 24- и 48-часовые культуры *N. meningitidis* с точностью 94,4 и 100 % соответственно. Для Andromas точность идентификации была ниже и составляла 88,9 и 94,4 % для 24- и 48-часовых культур *N. meningitidis* соответственно. Изоляты *N. gonorrhoeae* идентифицировали со 100 % вероятностью обеими системами. Установили, что точность идентификации культур *N. gonorrhoeae* с помощью Andromas снижается с увеличением времени инкубации. Аналогичный эффект для культур *N. meningitidis* получен в системе MALDI BioTyper. Вероятно, это может быть вызвано различиями в конструкции обеих систем, например, использовании разных математических алгоритмов для анализа данных.

Важно отметить положительный опыт MS идентификации микроорганизмов I–II групп патогенности на основе in-house библиотек. Регулярное обновление локальных баз данных в сравнении с коммерческими базами масс-спектров позволяет повысить точность идентификации методом времяпролетной масс-спектрометрии возбудителей таких осо-

бо опасных инфекций, как чума [18, 44, 45], холера [46–47], туляремия [48–51].

Эффективность использования среды языка программирования R и Mass-Up оценена нами в ходе собственных исследований для биоинформационной обработки данных MALDI-TOF MS в целях индикации и идентификации *B. anthracis*, *Brucella* spp. Используемый подход обеспечил достаточную внутривидовую дискриминирующую способность, подтверждаемую кластеризацией штаммов возбудителя сибирской язвы, соответствующей достигаемой при филогенетической оценке родства на основе генетического типирования [52]. Кроме того, указанное ПО успешно использовали при исследовании проб крови больных бруцеллезом людей [53].

Очевидно, что для повышения точности индикации и идентификации патогенных микроорганизмов методом MALDI-TOF MS, помимо коммерческого ПО, для проведения биоинформационной обработки полученных данных необходимо дополнительное ПО. Опыт использования MALDI BioTyper, SARAMIS Vitek-MS и Andromas для идентификации патогенных микроорганизмов, во-первых, определил необходимость создания in-house библиотек масс-спектров возбудителей I–II групп патогенности. Во-вторых, при использовании указанных платформ актуальна проблема получения корректных результатов меж- и внутривидовой дифференциации штаммов близкородственных видов. В-третьих, существующие различия конструкций этих систем обуславливают невозможность обмена данными между ними.

Учитывая ошибочные результаты идентификации видов и биоваров микроорганизмов с помощью платформ MALDI BioTyper, SARAMIS Vitek-MS и Andromas, ряд исследователей предложили статистическое моделирование на основе коммерческого ПО ClinProTools. Возможность построения классификационных моделей, способных дифференцировать штаммы по рассматриваемым признакам, определила востребованность этого ПО для MS анализа возбудителей особо опасных и природно-очаговых инфекций. Основными ограничениями для эксплуатации ПО ClinProTools выступают относительно высокая стоимость лицензии и расходных материалов, необходимость стандартизации условий культивирования штаммов микроорганизмов и протоколов пробоподготовки.

При определении таксономического положения бактерий на основе сравнительного анализа результатов масс-спектрометрического исследования с помощью общедоступных веб-приложений необходимо учитывать полное отсутствие возможности для оператора участвовать в выборе алгоритма, используемого для анализа данных. Вероятно, этим обусловлено малое количество публикаций об использовании этих ресурсов. Сочетание алгоритмов машинного обучения, открытого исходного кода в совокупности с удобным пользо-

вательским интерфейсом обеспечили эффективность ПО Mass-Up при идентификации и дифференциации микроорганизмов I–IV групп патогенности. Биоинформационная обработка данных белкового профилирования с помощью программного пакета MicrobeMS на основе коммерческого ПО MatLab позволяет повысить точность идентификации микроорганизмов, выявить особенности внутривидовых таксономических единиц. Интересно, что число публикаций зарубежных исследователей, активно использующих ПО Mass-Up, MicrobeMS, превышает количество российских публикаций, что позволяет говорить о высокой востребованности данных программных продуктов за рубежом.

Многообразие современных биоинформационных программных продуктов обуславливает реализацию широкого круга задач по обработке и интерпретации MALDI-TOF MS данных. Очевидно, что наибольшей востребованностью обладает ПО, сочетающее в себе экономическую доступность с комплексом функциональных возможностей для анализа информации. На наш взгляд, среда языка программирования R – общедоступная универсальная платформа, в которой успешно совмещены алгоритмы поиска и выявления аналитически значимых сигналов (биомаркеров) с возможностью проведения различных видов статистического анализа большого массива данных с последующей визуализацией результата, представляет собой эффективное для биоинформационного анализа данных времяпролетной масс-спектрометрии программное обеспечение.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Спицын А.Н., Уткин Д.В., Куклев В.Е., Портенко С.А., Германчук В.Г., Осина Н.А. Применение MALDI масс-спектрометрии в диагностике особо опасных инфекционных болезней: современное состояние и перспективы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; 3:77–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-3-77-82.
2. Lasch P., Grunow R., Antonation K., Weller S.A., Jacob D. Inactivation techniques for MALDI-TOF MS analysis of highly pathogenic bacteria – A critical review. *TrAC – Trend. Anal. Chem.* 2016; 85:112–119. DOI: 10.1016/j.trac.2016.04.012.
3. Lasch P., Jacob D., Grunow R., Schwecke T., Doellinger J. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of highly pathogenic bacteria. *TrAC – Trend. Anal. Chem.* 2016; 85:103–111. DOI: 10.1016/j.trac.2016.04.013.
4. Wigmann E.F., Behr J., Vogel R.F., Niessen L. MALDI-TOF MS fingerprinting for identification and differentiation of species within the *Fusarium* *fujikuroi* species complex. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019; 103(13):5323–5337. DOI: 10.1007/s00253-019-09794-z.
5. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.В., Васькова М.А., Тотолян А.А. Идентификация *Stenotrophomonas maltophilia* с использованием методов прямого секвенирования 16S рРНК MALDI-TOF масс-спектрометрии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(3):165–170. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-3-165-170.
6. Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Чайка И.А., Гончаренко Е.В., Ломов Ю.М. Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF в идентификации и типировании штаммов холерных вибрионов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(6):375–379. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-6-375-379.
7. Шаров Т.Н., Червакова М.П., Баркова И.А., Барков А.М., Викторов Д.В., Топорков А.В. Проблемы идентификации различных штаммов вегетативной формы *Bacillus anthracis* методом MALDI-TOF MS. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(5):316–318. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-3-316-318.
8. Sun L., Teramoto K., Sato H., Torimura M., Tao H., Shintani T. Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of *Lactobacillus plantarum*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006; 20(24):3789–3798. DOI: 10.1002/rcm.2801.
9. Suarez S., Ferroni A., Lotz A., Jolley K.A., Guérin P., Leto J., Dauphin B., Jamet A., Maiden M.C., Nassif X., Armengaud J. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J. Microbiol. Methods*. 2013; 94(3):390–396. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.07.021.
10. Croxatto A., Prod'homme G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012; 36(2):380–407. DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
11. Grunow R., Jacob D., Klee S., Schlembach D., Jackowski-Dohrmann S., Loenning-Baucke V., Eberspächer B., Swidsinski S. Brucellosis in a refugee who migrated from Syria to Germany and lessons learnt. *Euro Surveill.* 2016; 21(31):30311. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.31.30311.
12. Mesureur J., Arend S., Cellière B., Courault P., Cotte-Pattat P.J., Totty H., Deol P., Mick V., Girard V., Touchberry J., Burrows V., Lavigne J.P., O'Callaghan D., Monnin V., Kerié A. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(10):e0006874. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006874.
13. Sali M., De Maio F., Tarantino M., Garofolo G., Tittarelli M., Sacchini L., Zilli K., Pasquali P., Petrucci P., Marianelli C., Francia M., Sanguinetti M., Adone R. Rapid and safe one-step extraction method for the identification of *Brucella* strains at genus and species level by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*. 2018; 13(6):e0197864. DOI: 10.1371/journal.pone.0197864.
14. Ishihama Y., Schmidt T., Rappsilber J., Mann M., Hartl F.U., Kerner M.J., Frishman D. Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol. *BMC Genomics*. 2008; 9:102. DOI: 10.1186/1471-2164-9-102.
15. Hsieh S.Y., Tseng C.L., Lee Y.S., Kuo A.J., Sun C.F., Lin Y.H., Chen J.K. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol. Cell. Proteomics*. 2008; 7(2):448–456. DOI: 10.1074/mcp.M700339-MCP200.
16. Faron M.L., Buchan B.W., Ledebore N.A. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: methodology, performance, and optimization. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55(12):3328–3338. DOI: 10.1128/JCM.00868-17.
17. Wei J., Zhang H., Zhang H., Zhang E., Zhang B., Zhao F., Xiao D. Novel strategy for rapidly and safely distinguishing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* by use of peptide mass fingerprints based on matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 59(1):02358–20. DOI: 10.1128/JCM.02358-20.
18. Ayyadurai S., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol.* 2010; 10:285. DOI: 10.1186/1471-2180-10-285.
19. Sonthayanon P., Jaresitthikunchai J., Mangmee S., Thiangtrongjit T., Wuthiekanun V., Amornchai P., Newton P., Phetsouvanh R., Day N.P., Roytrakul S. Whole cell matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification of *Leptospira* spp. in Thailand and Lao PDR. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019; 13(4):e0007232. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007232.
20. Зуева Е.В., Стоянова Н.А., Токарев Н.К., Тотолян А.А. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ штаммов *Leptospira* spp., используемых в серодиагностике лептоспироза. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; 6:28–36.
21. Rettinger A., Krupka I., Grünwald K., Dyachenko V., Fingerle V., Konrad R., Raschel H., Busch U., Sing A., Straubinger R.K., Huber I. *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiol.* 2012; 12:185. DOI: 10.1186/1471-2180-12-185.
22. Tomachewski D., Galvão C.W., de Campos Júnior A., Guimarães A.M., Ferreira da Rocha J.C., Etto R.M. Ribopeaks: a web tool for bacterial classification through m/z data from ribosomal proteins. *Bioinformatics*. 2018; 34(17):3058–3060. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty215.
23. Alnakip M.E., Rhouma N.R., Abd-Elfatah E.N., Quintela-Balaja M., Böhm K., Fernández-No I., Barros-Velázquez J. Discrimination of major and minor streptococci incriminated in bovine mastitis by MALDI-TOF MS fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing. *Res. Vet. Sci.* 2020; 132:426–438. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.07.027.
24. El-Jeni R., Böhm K., El Bour M., Calo-Mata P., Kefi R.,

- Barros-Velázquez J., Bouhaouala-Zahar B. Rapid genus identification of selected lactic acid bacteria isolated from *Mugil cephalus* and *Oreochromis niloticus* organs using MALDI-TOF. *Ann. Microbiol.* 2019; 69(1):1–15. DOI: 10.1007/s13213-018-1357-8.
25. Torres-Corral Y., Fernández-Alvarez C., Santos Y. Proteomic and molecular fingerprinting for identification and tracking of fish pathogenic *Streptococcus*. *Aquaculture*. 2019; 498:322–334. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.041.
26. Christoforidou S., Kyritsi M., Boukouvala E., Ekateriniadou L., Zdragas A., Samouris G., Hadjichristodoulou C. Identification of *Brucella* spp. isolates and discrimination from the vaccine strain Rev. 1 by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mol. Cell. Prob.* 2020; 51:101533. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101533.
27. Kyritsi M.A., Kristo I., Hadjichristodoulou C. Serotyping and detection of pathogenicity loci of environmental isolates of *Legionella pneumophila* using MALDI-TOF MS. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2020; 224:113441. DOI: 10.1016/j.ijheh.2019.113441.
28. Torres I., Giménez E., Vinuesa V., Pascual T., Moya J.M., Alberola J., Martínez-Sapiña A., Navarro D. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) proteomic profiling of cerebrospinal fluid in the diagnosis of enteroviral meningitis: a proof-of-principle study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 37(12):2331–39. DOI: 10.1007/s10096-018-3380-x.
29. Martina P., Leguizamon M., Prieto C.I., Sousa S.A., Montanaro P., Draghi W.O., Stämmler M., Bettiol M., de Carvalho C.C.R., Palau J., Figoli C., Alvarez F., Benetti S., Lejona S., Vescina C., Ferreras J., Lasch P., Lagares A., Zorreguieta A., Leitão J.H., Yantorno O.M., Bosch A. *Burkholderia puraquae* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018; 68(1):14–20. DOI: 10.1099/ijsem.0.002293.
30. Blumschein C., Pfeifer Y., Werner G., John C., Schneider A., Lasch P., Doellinger J. Unbiased antimicrobial resistance detection from clinical bacterial isolates using proteomics. *bioRxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.11.17.386540.
31. Dieckmann R., Hammerl J.A., Hahmann H., Wicke A., Kleta S., Dabrowski P.W., Nitsche A., Stämmler M., Al Dahouk S., Lasch P. Rapid characterisation of *Klebsiella oxytoca* isolates from contaminated liquid hand soap using mass spectrometry, FTIR and Raman spectroscopy. *Faraday Discuss.* 2016; 187:353–75. DOI: 10.1039/c5fd00165j.
32. Daumas A., Alingrin J., Ouedraogo R., Villani P., Leone M., Mege J.-L. MALDI-TOF MS monitoring of PBMC activation status in sepsis. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1):355. DOI: 10.1186/s12879-018-3266-7.
33. Lasch P., Wahab T., Weil S., Pályi B., Tomaso H., Zange S., Kiland Granerud B., Drevinek M., Kokotovic B., Wittwer M., Pflüger V., Di Caro A., Stämmler M., Grunow R., Jacob D. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: results of an interlaboratory ring trial. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(8):2632–2640. DOI: 10.1128/JCM.00813-15.
34. Cheng W.C., Jan I.S., Chen J.M., Teng S.H., Teng L.J., Sheng W.H., Hsueh P.R. Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Vibrio* species. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(5):1741–1744. DOI: 10.1128/JCM.00105-15.
35. Rychert J., Creely D., Mayo-Smith L.M., Calderwood S.B., Ivers L.C., Ryan E.T., Boney J., Qadri F., Ahmed D., Ferraro M.J., Harris J.B. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(1):329–331. DOI: 10.1128/JCM.02666-14.
36. Балахонов С.В., Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Куликалова Е.С., Остяк А.С. MALDI-TOF масс-спектрометрическое определение видовой принадлежности патогенов в совершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями. *Бактериология*. 2016; 1(1):88–94. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-88-94.
37. Миронова Л.В., Басов Е.А., Афанасьев М.В., Хунхеева Ж.Ю., Миткева 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. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19(6):27–36.
38. Афанасьев М.В., Остяк А.С., Балахонов С.В. Апробация метода масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорпцией/ионизацией для идентификации возбудителя чумы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 8:39–43.
39. Wittwer M., Heim J., Schär M., Dewarrat G., Schürch N. Tapping the potential of intact cell mass spectrometry with a combined data analytical approach applied to *Yersinia* spp.: detection, differentiation and identification of *Y. pestis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 2011; 34(1):12–19. DOI: 10.1016/j.syapm.2010.11.006.
40. Rouffaer L.O., Baert K., Van den Abele A.M., Cox I., Vanantwerpen G., De Zutter L., Strubbe D., Vranckx K., Lens L., Haesebrouck F., Delmée M., Pasmans F., Martel A. Low prevalence of human enteropathogenic *Yersinia* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in Flanders. *PLoS One*. 2017; 12(4):e0175648. DOI: 10.1371/journal.pone.0175648.
41. Guliev R.R., Suntsova A.Y., Vostrikova T.Y., Shchegolikhin A.N., Popov D.A., Guseva M.A., Shevelev A.B., Kurochkin I.N. Discrimination of *Staphylococcus aureus* strains from coagulase-negative staphylococci and other pathogens by Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal. Chem.* 2020; 92(7):4943–4948. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05050.
42. Cuénod A., Foucault F., Pflüger V., Egli A. Factors associated with MALDI-TOF mass spectral quality of species identification in clinical routine diagnostics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11:646648. DOI: 10.3389/fcimb.2021.646648.
43. Morel F., Jacquier H., Desroches M., Fihman V., Kumanski S., Cambau E., Decousser J.W., Berçot B. Use of Andromas and Bruker MALDI-TOF MS in the identification of *Neisseria*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 37(12):2273–2277. DOI: 10.1007/s10096-018-3368-6.
44. Lasch P., Drevinek M., Nattermann H., Grunow R., Stämmler M., Dieckmann R., Schwecke T., Naumann D. Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. *Anal. Chem.* 2010; 82(20):8464–8475. DOI: 10.1021/ac101036s.
45. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяк А.С., Витязева С.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Ивченко Н.И., Рождественский Е.Н., Висков Е.Н., Фомина Л.А. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *Pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 1:60–65. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-60-65.
46. 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(4):226–230. DOI: 10.1016/j.micres.2011.09.002.
47. Emami K., Askari V., Ullrich M., Mohinudeen K., Anil A.C., Khandeparker L., Burgess J.G., Mesbahi E. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*. 2012; 7(6):e38515. DOI: 10.1371/journal.pone.0038515.
48. López-Ramos I., Hernández M., Rodríguez-Lázaro D., Gutiérrez M.P., Zarzosa P., Orduña A., March G.A. Quick identification and epidemiological characterization of *Francisella tularensis* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*. 2020; 177:106055.
49. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Spletstoeser W.D. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1061–9. DOI: 10.1128/JCM.01953-09.
50. Müller W., Hotzel H., Otto P., Karger A., Bettin B., Bocklisch H., Braune S., Eskens U., Hörmansdorfer S., Konrad R., Nesseler A., Peters M., Runge M., Schmooch G., Schwarz B.A., Sting R., Myrténäs K., Karlsson E., Forsman M., Tomaso H. German *Francisella tularensis* isolates from European brown hares (*Lepus europaeus*) reveal genetic and phenotypic diversity. *BMC Microbiol.* 2013; 13:61. DOI: 10.1186/1471-2180-13-61.
51. Ульшина Д.В., Еременко Е.И., Ковалев Д.А., Рязанова А.Г., Кузнецова И.В., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Бобрышева О.В., Сирица Ю.В., Куличенко А.Н. Выявление особенностей масс-спектров белковых экстрактов споровой и вегетативной форм возбудителя сибирской чумы методом времяпролетной масс-спектрометрии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2018; 6:66–72. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-6-66-72.
52. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Бобрышева О.В., Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Ковалева Н.И., Куличенко А.Н. Применение времяпролетной масс-спектрометрии для диагностики бруцеллеза и межвидовой дифференциации штаммов *Brucella* spp. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7(4):15–24. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-14002.

References

- Spitsyn A.N., Utkin D.V., Kuklev V.E., Portenko S.A., Germenchuk V.G., Osina N.A. Application of MALDI mass-spectrometry for diagnostics of particularly dangerous infectious diseases: current state of affairs and prospects. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2014; (3):77–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-3-77-82.
- Lasch P., Grunow R., Antonation K., Weller S.A., Jacob D. Inactivation techniques for MALDI-TOF MS analysis of highly pathogenic bacteria – A critical review. *TrAC – Trend. Anal. Chem.* 2016; 85:112–119. DOI: 10.1016/j.trac.2016.04.012.
- Lasch P., Jacob D., Grunow R., Schwecke T., Doellinger J. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of highly pathogenic bacteria. *TrAC – Trend. Anal. Chem.* 2016; 85:103–111. DOI: 10.1016/j.trac.2016.04.013.

4. Wigmann E.F., Behr J., Vogel R.F., Niessen L. MALDI-TOF MS fingerprinting for identification and differentiation of species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019; 103(13):5323–5337. DOI: 10.1007/s00253-019-09794-z.
5. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.V., Vashukova M.A., Totolian A.A. The identification of *Stenotrophomonas maltophilia* using the techniques of direct sequencing 16S rRNA and MALDI-TOF mass-spectrometry. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2017; 62(3):165–170. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-3-165-170.
6. Telesmanitch N.R., Chaika S.O., Chaika I.A., Goncharenko E.V., Lomov Yu.M. The mass-spectrometric analysis of MALDI-TOF in identification and typing of cholera vibrio strains/ *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2016; 61(6):375–379. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-6-375-379.
7. Sharov T.N., Chervakova M.P., Barkova I.A., Barkov A.M., Viktorov D.V., Toporkov A.V. The problems of identification of various strains of vegetative form of *Bacillus anthracis* using MALDI-TOF MS technique. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2017; 62(5):316–318. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-3-316-318.
8. Sun L., Teramoto K., Sato H., Torimura M., Tao H., Shintani T. Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of *Lactobacillus plantarum*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006; 20(24):3789–3798. DOI: 10.1002/rcm.2801.
9. Suarez S., Ferroni A., Lotz A., Jolley K.A., Guérin P., Leto J., Dauphin B., Jamet A., Maiden M.C., Nassif X., Armengaud J. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J. Microbiol. Methods.* 2013; 94(3):390–396. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.07.021.
10. Croxatto A., Prod'homme G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012; 36(2):380–407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
11. Grunow R., Jacob D., Klee S., Schlembach D., Jackowski-Dohrmann S., Loening-Baucke V., Eberspächer B., Swidsinski S. Brucellosis in a refugee who migrated from Syria to Germany and lessons learnt. *Euro Surveill.* 2016; 21(31):30311. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.31.30311.
12. Mesureur J., Arend S., Cellière B., Courault P., Cotte-Pattat P.J., Totty H., Deol P., Mick V., Girard V., Touchberry J., Burrows V., Lavigne J.P., O'Callaghan D., Monnin V., Keriel A. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(10):e0006874. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006874.
13. Sali M., De Maio F., Tarantino M., Garofolo G., Tittarelli M., Sacchini L., Zilli K., Pasquali P., Petrucci P., Marianelli C., Francia M., Sanguinetti M., Adone R. Rapid and safe one-step extraction method for the identification of *Brucella* strains at genus and species level by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One.* 2018; 13(6):e0197864. DOI: 10.1371/journal.pone.0197864.
14. Ishihama Y., Schmidt T., Rappsilber J., Mann M., Hartl F.U., Kerner M.J., Frishman D. Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol. *BMC Genomics.* 2008; 9:102. DOI: 10.1186/1471-2164-9-102.
15. Hsieh S.Y., Tseng C.L., Lee Y.S., Kuo A.J., Sun C.F., Lin Y.H., Chen J.K. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol. Cell. Proteomics.* 2008; 7(2):448–456. DOI: 10.1074/mcp.M700339-MCP200.
16. Faron M.L., Buchan B.W., Ledeboer N.A. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: methodology, performance, and optimization. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55(12):3328–3338. DOI: 10.1128/JCM.00868-17.
17. Wei J., Zhang H., Zhang H., Zhang E., Zhang B., Zhao F., Xiao D. Novel strategy for rapidly and safely distinguishing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* by use of peptide mass fingerprints based on matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 59(1):02358–20. DOI: 10.1128/JCM.02358-20.
18. Ayyadurai S., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol.* 2010; 10:285. DOI: 10.1186/1471-2180-10-285.
19. Sonthayanon P., Jaresithikunchai J., Mangmee S., Thiangtrongjit T., Wuthiekanun V., Amornchai P., Newton P., Phetsouvanh R., Day N.P., Roytrakul S. Whole cell matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification of *Leptospira* spp. in Thailand and Lao PDR. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019; 13(4):e0007232. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007232.
20. Zueva E.V., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Totolian A.A. MALDI-TOF mass spectrometric analysis of *Leptospira* spp. strains used in serodiagnosis of leptospirosis. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii. [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2015; 6:28–36.
21. Rettinger A., Krupka L., Grünwald K., Dyachenko V., Fingerle V., Konrad R., Raschel H., Busch U., Sing A., Straubinger R.K., Huber I. *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiol.* 2012; 12:185. DOI: 10.1186/1471-2180-12-185.
22. Tomachewski D., Galvão C.W., de Campos Júnior A., Guimarães A.M., Ferreira da Rocha J.C., Etto R.M. Ribopeaks: a web tool for bacterial classification through m/z data from ribosomal proteins. *Bioinformatics.* 2018; 34 (17): 3058–3060. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty215.
23. Alnakip M.E., Rhouma N.R., Abd-Elfatah E.N., Quintela-Balaja M., Böhme K., Fernández-No I., Barros-Velázquez J. Discrimination of major and minor streptococci incriminated in bovine mastitis by MALDI-TOF MS fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing. *Res. Vet. Sci.* 2020; 132: 426–438. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.07.027.
24. El-Jeni R., Böhme K., El Bour M., Calo-Mata P., Kefi R., Barros-Velázquez J., Bouhaouala-Zahar B. Rapid genus identification of selected lactic acid bacteria isolated from *Mugil cephalus* and *Oreochromis niloticus* organs using MALDI-TOF. *Ann. Microbiol.* 2019; 69(1):1–15. DOI: 10.1007/s12213-018-1357-8.
25. Torres-Corral Y., Fernández-Alvarez C., Santos Y. Proteomic and molecular fingerprinting for identification and tracking of fish pathogenic *Streptococcus*. *Aquaculture.* 2019; 498:322–334. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.041.
26. Christoforidou S., Kyritsi M., Boukouvala E., Ekateriniadou L., Zdragas A., Samouris G., Hadjichristodoulou C. Identification of *Brucella* spp. isolates and discrimination from the vaccine strain Rev. 1 by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mol. Cell. Prob.* 2020; 51:101533. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101533.
27. Kyritsi M.A., Kristo I., Hadjichristodoulou C. Serotyping and detection of pathogenicity loci of environmental isolates of *Legionella pneumophila* using MALDI-TOF MS. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2020; 224:113441. DOI: 10.1016/j.ijheh.2019.113441.
28. Torres I., Giménez E., Vinuesa V., Pascual T., Moya J.M., Alberola J., Martínez-Sapiña A., Navarro D. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) proteomic profiling of cerebrospinal fluid in the diagnosis of enteroviral meningitis: a proof-of-principle study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 37(12):2331–2339. DOI: 10.1007/s10096-018-3380-x.
29. Martina P., Leguizamon M., Prieto C.I., Sousa S.A., Montanaro P., Draghi W.O., Stämmler M., Bettiol M., de Carvalho C.C.R., Palau J., Figoli C., Alvarez F., Benetti S., Lejona S., Vescina C., Ferreras J., Lasch P., Lagares A., Zorreguieta A., Leitão J.H., Yantorno O.M., Bosch A. *Burkholderia parvula* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018; 68(1):14–20. DOI: 10.1099/ijsem.0.002293.
30. Blumenschein C., Pfeifer Y., Werner G., John C., Schneider A., Lasch P., Doellinger J. Unbiased antimicrobial resistance detection from clinical bacterial isolates using proteomics. *bioRxiv.* 2020. DOI: 10.1101/2020.11.17.386540.
31. Dieckmann R., Hammerl J.A., Hahmann H., Wicke A., Kleta S., Dabrowski P.W., Nitsche A., Stämmler M., Al Dahouk S., Lasch P. Rapid characterization of *Klebsiella oxytoca* isolates from contaminated liquid hand soap using mass spectrometry, FTIR and Raman spectroscopy. *Faraday Discuss.* 2016; 187:353–75. DOI: 10.1039/c5fd00016j.
32. Daumas A., Alingrin J., Ouedraogo R., Villani P., Leone M., Mege J.-L. MALDI-TOF MS monitoring of PBMC activation status in sepsis. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1):355. DOI: 10.1186/s12879-018-3266-7.
33. Lasch P., Wahab T., Weil S., Pályi B., Tomaso H., Zange S., Kiland Granerud B., Drevinek M., Kokotovic B., Wittwer M., Pflüger V., Di Caro A., Stämmler M., Grunow R., Jacob D. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: results of an interlaboratory ring trial. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(8):2632–2640. DOI: 10.1128/JCM.00813-15.
34. Cheng W.C., Jan I.S., Chen J.M., Teng S.H., Teng L.J., Sheng W.H., Hsueh P.R. Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Vibrio* species. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(5):1741–1744. DOI: 10.1128/JCM.00105-15.
35. Rychert J., Creely D., Mayo-Smith L.M., Calderwood S.B., Ivers L.C., Ryan E.T., Boncy J., Qadri F., Ahmed D., Ferraro M.J., Harris J.B. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(1):329–331. DOI: 10.1128/JCM.02666-14.
36. Balakhonov S.V., Mironova L.V., Afanas'ev M.V., Kulikalova E.S., Ostyak A.S. MALDI-TOF mass-spectrometric determination of the species of pathogens in improving the epidemiological surveillance of overdangerous infectious diseases. *Bakteriologiya. [Bacteriology]*. 2016; 1 (1): 88–94. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-88-94.
37. Mironova L.V., Basov E.A., Afanas'ev M.V., Khunkheeva Zh.Yu., Mitkeeva S.K., Ganin V.S., Urbanovich L.Ya., Kulikalova E.S., Gol'dapel' E.G., Balakhonov S.V. MALDI-TOF mass spectrometric analysis with molecular-genetic identification of *Vibrio*

spp. in the system for monitoring of vibrioflora of surface water bodies. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2014; 19 (6): 27–36.

38. Afanas'ev M.V., Ostyak A.S., Balakhonov S.V. Approbation of mass spectrometry with matrix-activated laser desorption / ionization for identification of the plague pathogen. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2014; 8: 39–43.

39. Wittwer M., Heim J., Schär M., Dewarrat G., Schürch N. Tapping the potential of intact cell mass spectrometry with a combined data analytical approach applied to *Yersinia* spp.: detection, differentiation and identification of *Y. pestis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 2011; 349(1):12–19. DOI: 10.1016/j.syapm.2010.11.006.

40. Rouffaer L.O., Baert K., Van den Abeele A.M., Cox I., Vanantwerpen G., De Zutter L., Strubbe D., Vranckx K., Lens L., Haesebrouck F., Delmée M., Pasmans F., Martel A. Low prevalence of human enteropathogenic *Yersinia* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in Flanders. *PLoS One.* 2017; 12(4):e0175648. DOI: 10.1371/journal.pone.0175648.

41. Guliev R.R., Suntsova A.Y., Vostrikova T.Y., Shchegolikhin A.N., Popov D.A., Guseva M.A., Shevelev A.B., Kurochkin I.N. Discrimination of *Staphylococcus aureus* strains from coagulase-negative staphylococci and other pathogens by Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal. Chem.* 2020; 92(7):4943–4948. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05050.

42. Cuénod A., Foucault F., Pflüger V., Egli A. Factors associated with MALDI-TOF mass spectral quality of species identification in clinical routine diagnostics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11: 646648. DOI: 10.3389/fcimb.2021.646648.

43. Morel F., Jacquier H., Desroches M., Fihman V., Kumanski S., Cambau E., Decousser J.W., Berçot B. Use of Andromas and Bruker MALDI-TOF MS in the identification of *Neisseria*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 37(12):2273–2277. DOI: 10.1007/s10096-018-3368-6.

44. Lasch P., Drevinek M., Nattermann H., Grunow R., Stämmler M., Dieckmann R., Schwecke T., Naumann D. Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. *Anal. Chem.* 2010; 82(20):8464–8475. DOI: 10.1021/ac101036s.

45. Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vityazeva S.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Ivzhenko N.I., Rozhdestvensky E.N., Viskov E.N., Fomina L.A. The first case of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* isolation in the territory of Altai mountain natural plague focus. Communication 1. Microbiological characteristics, molecular-genetic and mass-spectrometric identification of the isolate. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (1):60–65. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-60-65.

46. 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(4):226–230. DOI: 10.1016/j.micres.2011.09.002.

47. Emami K., Askari V., Ullrich M., Mohinudeen K., Anil A.C., Khandeparker L., Burgess J.G., Mesbahi E. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. *PloS One.* 2012; 7(6):e38515. DOI: 10.1371/journal.pone.0038515.

48. López-Ramos I., Hernández M., Rodríguez-Lázaro D., Gutiérrez M.P., Zarzosa P., Orduña A., March G.A. Quick identification and epidemiological characterization of *Francisella tularensis* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods.* 2020; 177:106055.

49. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Spletstoesser W.D. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1061–9. DOI: 10.1128/JCM.01953-09.

50. Müller W., Hotzel H., Otto P., Karger A., Bettin B., Bocklisch H., Braune S., Eskens U., Hörmansdorfer S., Konrad R., Nesselner A., Peters M., Runge M., Schmoock G., Schwarz B.A., Sting R., Myrtenäs K., Karlsson E., Forsman M., Tomaso H. German *Francisella tularensis* isolates from European brown hares (*Lepus europaeus*) reveal genetic and phenotypic diversity. *BMC Microbiol.* 2013; 13:61. DOI: 10.1186/1471-2180-13-61.

51. Ul'shina D.V., Eremenko E.I., Kovalev D.A., Ryazanova A.G., Kuznetsova I.V., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Bobrysheva O.V., Siritsa Yu.V., Kulichenko A.N. Revealing the features of mass spectra of protein extracts of spore and vegetative forms of anthrax pathogen using time-of-flight mass spectrometry. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii. [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2018; 6: 66–72. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-6-66-72.

52. Ul'shina D.V., Kovalev D.A., Bobrysheva O.V., Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Kovaleva N.I., Kulichenko A.N. The use of time-of-flight mass spectrometry for the diagnosis of brucellosis and inter-specific differentiation of *Brucella* spp. *Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie. [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2018; 7(4):15–24. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-14002.

Authors:

Ul'shina D.V., Kovalev D.A., Kuznetsova I.V., Bobrysheva O.V., Krasovskaya T.L., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355000, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Об авторах:

Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Кузнецова И.В., Бобрышева О.В., Красовская Т.Л., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация. 355000, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru