

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-145-150

УДК 616.98:579.841.95

А.К. Сынгеева, А.С. Остяк, Е.С. Куликалова, А.В. Мазепа, К.В. Наумова,  
С.В. Балахонов**Эффективность применения MALDI-ToF масс-спектрометрии  
при идентификации штаммов *Francisella tularensis****ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск,  
Российская Федерация*

**Цель** исследования – оценить эффективность применения MALDI-ToF масс-спектрометрии при идентификации коллекционных и свежеевыделенных штаммов возбудителя туляремии с использованием базы данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper». **Материалы и методы.** Исследовано 142 штамма *Francisella tularensis*, в числе которых 59 коллекционных и 83 свежеевыделенных. Для их идентификации использовали бактериологический, молекулярно-генетический и масс-спектрометрический методы исследования. Сбор масс-спектров, анализ, генерация и расширение референсных библиотек выполнены на масс-анализаторе Microflex LT с использованием пакета программ FlexControl v. 3.3, FlexAnalysis v. 3.3, MALDI Biotyper 3.0. Кластерный анализ осуществлен в программе BioNumerics 7.6. **Результаты и обсуждение.** Оценена возможность идентификации возбудителя туляремии с помощью расширенной базы данных MALDI Biotyper 3.0 «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper». При идентификации до уровня вида результаты масс-спектрометрии коллекционных и свежеевыделенных штаммов показали 91,5 и 97,6 % достоверности соответственно. В определении родовой принадлежности надежность идентификации составила 100 %. Таким образом, метод MALDI-ToF масс-спектрометрии позволяет достоверно проводить видовую и родовую идентификацию штаммов *F. tularensis*. На основании кластерного анализа 66 штаммов *F. tularensis* в программе BioNumerics 7.6. с использованием Pearson correlation по алгоритму UPGMA оценена возможность подвидовой дифференциации. В связи со схожестью белковых профилей штаммов *F. tularensis* четкой дифференциации на подвиды добиться не удалось. Для успешного проведения подвидовой дифференциации необходимо использовать другие варианты подготовки образцов, приборы нового поколения с более высокой разрешающей способностью, а также применять дополнительные подходы и инструменты анализа.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, масс-спектрометрия, MALDI-ToF, внутривидовая дифференциация.

*Корреспондирующий автор:* Сынгеева Аюна Константиновна, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

*Для цитирования:* Сынгеева А.К., Остяк А.С., Куликалова Е.С., Мазепа А.В., Наумова К.В., Балахонов С.В. Эффективность применения MALDI-ToF масс-спектрометрии при идентификации штаммов *Francisella tularensis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:145–150. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-145-150

*Поступила 02.06.2020. Отправлена на доработку 11.10.2021. Принята к публ. 25.08.2022.*

А.К. Syngeeva, A.S. Ostyak, E.S. Kulikalova, A.V. Mazepa, K.V. Naumova, S.V. Balakhonov

**The Effectiveness of MALDI-ToF Mass Spectrometry in Identification  
of *Francisella tularensis* Strains***Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation*

**Abstract.** The aim of the study was to evaluate the effectiveness of MALDI-ToF mass spectrometry in the identification of collection and newly isolated strains of tularemia pathogen using the database “Protein profiles of mass spectra of microorganisms belonging to I–II pathogenicity groups for the MALDI Biotyper software”. **Materials and methods.** We investigated 142 strains of *Francisella tularensis*, including 59 collection strains and 83 newly isolated ones. Bacteriological, molecular-genetic and proteomic research methods were used to identify them. The acquisition of mass spectra, analysis, generation and expansion of reference libraries were performed on a mass analyzer “Microflex LT” using FlexControl v. 3.3, FlexAnalysis v. 3.3, and MALDI Biotyper 3.0 software packages. The cluster analysis was performed using the BioNumerics 7.6 software. **Results and discussion.** The possibility of identifying tularemia pathogen has been assessed using the extended database for MALDI Biotyper 3.0 “Protein profiles of mass spectra of microorganisms belonging to I–II pathogenicity groups for the MALDI Biotyper software”. During identification to the species level, the significance of mass spectrometry results for collection strains and newly isolated ones was 91.5 % and 97.6 %, respectively. In determining the genus appurtenance, the reliability of identification was 100 %. Thus, the MALDI-ToF mass spectrometry method allows for accurate species and genus identification of *F. tularensis* strains. Based on the cluster analysis of 66 *F. tularensis* strains in BioNumerics 7.6 software using «Pearson correlation» and the UPGMA algorithm, the possibility of subspecies differentiation has been evaluated. Due to the similarity of protein profiles of *F. tularensis* strains, a clear differentiation into subspecies could not be achieved. It is necessary to use other options for sample preparation, new generation devices with higher resolution, as well as apply additional approaches and analysis tools for successful subspecific differentiation.

**Key words:** *Francisella tularensis*, mass spectrometry, MALDI-TOF, intraspecific differentiation.

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

Corresponding author: Ayuna K. Syngeeva, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Syngeeva A.K., Ostyak A.S., Kulikalova E.S., Mazepa A.V., Naumova K.V., Balakhonov S.V. The Effectiveness of MALDI-ToF Mass Spectrometry in Identification of *Francisella tularensis* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:145–150. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-145-150

Received 02.06.2020. Revised 11.10.2021. Accepted 25.08.2022.

Syngeeva A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2995-4452>  
Kulikalova E.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7034-5125>  
Ostyak A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9391-6779>

Mazepa A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0843-4757>  
Naumova K.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5250-7530>  
Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Важным разделом эпидемиологического надзора за туляремией в России является совершенствование лабораторной диагностики с использованием новых методических приемов обнаружения возбудителя в исследуемом материале [1]. Так, с 2014 г. в лабораторную практику внедрен метод времяпролетной масс-спектрометрии (времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI-ToF MS), позволяющий идентифицировать бактерии путем сравнения масс-спектров белков исследуемых бактериальных клеток с помощью референсных эталонных спектров, хранящихся в базе данных (MP 4.2.0089-14). MALDI-ToF MS уже рекомендовал себя в микробиологической практике как быстрый, надежный и достоверный метод для идентификации возбудителей особо опасных инфекций (ООИ) [2]. Поскольку в базу данных MALDI Biotyper 3.0 не входили спектры возбудителей I–II групп патогенности, в 2016 г. противочумными институтами России проведено ее расширение путем добавления референсных белковых спектров штаммов опасных патогенов. В результате импортирована база данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper» (свидетельство от 15.03.2016 № 2016620345), позволяющая проводить ускоренную идентификацию туляремии, в которую входит 35 референсных спектров *Francisella tularensis*, а также 6 спектров близкородственного вида *F. philomiragia*. Однако с тех пор опубликовано мало статей, отражающих практический опыт применения этого метода и оценки эффективности идентификации возбудителя туляремии с использованием обновленной базы данных.

**Цель** исследования – оценить эффективность применения MALDI-ToF масс-спектрометрии при идентификации коллекционных и свежесделанных штаммов возбудителя туляремии с применением базы данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper».

## Материалы и методы

**Штаммы микроорганизмов.** Исследовано 142 штамма *F. tularensis*, в числе которых 59 коллекционных и 83 свежесделанных на курируемой Иркутским противочумным институтом территории.

Биохимические свойства для определения подвидовой принадлежности изучали путем посева штаммов на среды с глицерином и цитруллином. Культивировали в течение двух суток при 37 °С.

Определение биовара туляремийного микроба выполняли путем посева 0,1 мл взвеси  $10^9$  м.к. на чашку Петри с Ft-агаром с последующим применением диско-диффузионного метода (эритромицин). Через двое суток по наличию зоны задержки роста производили учет результатов.

Для масс-спектрометрического исследования использовали 24-часовые культуры, выращенные при 37 °С на FT-агаре (pH 7,0). Подготовку проб выполняли согласно методическим рекомендациям MP 4.2.0089-14 (протокол идентификации для неспорообразующих бактерий).

**Молекулярно-генетический анализ.** Выделение ДНК двухсуточных агаровых культур *F. tularensis* осуществляли коммерческим набором «РИБО-преп» (ЦНИИ эпидемиологии, Россия).

Выявление видоспецифичного гена *iglBC F. tularensis* проводилось с использованием тест-системы «Набор реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени» (Российский противочумный институт «Микроб», Россия).

Детекцию генов *pdpA* и *pdpD* для определения подвида туляремийного микроба осуществляли с использованием универсальных коммерческих наборов для амплификации ДНК («Синтол», Россия) и ген-специфичных праймеров [3].

**Масс-спектрометрический анализ.** Спектры собирали в автоматическом режиме на масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, США) с использованием программы Flex Control (v. 3.3, build 108), при функционировании прибора в линейном позитивном режиме со следующими параметрами: напряжение Ion Source 1 (IS1) – 20 кВ, Ion Source 2 (IS2) – 18,05 кВ, напряжение на фокусирующей линзе – 6 кВ, частота азотного лазера – 60 Гц. Параметры работы прибора оптимизировали для диапазона отношения массы иона к его заряду ( $m/z$ ) от 2000 до 20000. Каждый спектр получали путем суммирования 6 одиночных спектров (240 импульсов лазера). Для получения референсных библиотек спектров образец исследовали в 20 повторах, для идентификации – в 5. Анализ спектров, генерацию, расширение референсных библиотек и идентификацию выполняли с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, США).

Таксономическая принадлежность микроорганизма и достоверность идентификации методом MALDI-ToF MS оценивалась в соответствии со значением индекса совпадения (score value, SV). Значение  $SV \geq 2,3$  соответствовало достоверной идентификации до вида; SV менее 2,299, но более

2,000 – достоверной идентификации до рода, вероятной до вида, значение SV в диапазоне 1,7–1,999 рассматривали как вероятную идентификацию до рода и менее 1,7 – недостоверный результат.

**Кластерный анализ.** Кластерный анализ проведен в программах MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, США) и BioNumerics v. 7.6 (Applied Maths, Бельгия).

### Результаты и обсуждение

На первом этапе работы исследованы 59 коллекционных штаммов *F. tularensis*, выделенных с 1937 по 2014 год, в пятикратной повторности. Белковое профилирование с применением MALDI-ToF MS позволило провести достоверную идентификацию до вида *F. tularensis* для 54 штаммов (SV 2,445–2,848), а для пяти – достоверную идентификацию до рода, вероятную до вида (SV 2,195–2,292) (табл. 1).

Также в ходе мониторинговой деятельности института в период с 2015 по 2021 год выделено 83 штамма возбудителя туляремии, среди которых обнаружено 34 штамма подвида *mediasiatica*, циркулирующих преимущественно на территориях Алтайского края, Республики Алтай и Красноярского края. Внутривидовая характеристика штаммов получена в результате традиционных лабораторных тестов (ферментация цитруллина и глицерина; выявление генов *pdpA*, *pdpD*). Далее методом MALDI-ToF MS достоверно идентифицированы до вида *F. tularensis* 48 штаммов голарктического подвида, один – до рода. Из группы штаммов среднеазиатского подвида 33 идентифицированы до вида, а один – до рода (табл. 2).

Таким образом, при идентификации до уровня вида результаты масс-спектрометрии коллекционных и свежесыведенных штаммов показали 91,5 и 97,6 % совпадение соответственно. В определении

Таблица 1 / Table 1

Результаты масс-спектрометрической идентификации коллекционных штаммов *F. tularensis*, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока с 1941 по 2014 год (N=59)

The *F. tularensis* collection strains isolated in Siberia and Far East between 1941 and 2014 (N=59), mass spectrometric identification results

Результат идентификации Identification result	Территория Territory	Количество исследованных штаммов Number of studied strains	Значение SV SV value
Достоверная идентификация до вида Reliable identification up to the species	Алтайский край Altai Territory	7	2,531–2,647
	Забайкальский край Trans-Baikal Territory	4	2,569–2,637
	Иркутская область Irkutsk Region	5	2,365–2,763
	Камчатский край Kamchatka Territory	1	2,627
	Кемеровская область Kemerovo Region	1	2,712
	Красноярский край Krasnoyarsk Territory	8	2,509–2,660
	Новосибирская область Novosibirsk Region	2	2,342–2,390
	Республика Алтай Altai Republic	1	2,580
	Республика Бурятия Buryat Republic	9	2,428–2,731
	Республика Тыва Tuva Republic	1	2,538
	Республика Якутия Yakutia Republic	2	2,622–2,641
	Сахалинская область Sakhalin Region	5	2,586–2,835
	Тюменская область Tyumen Region	1	2,666
	Хабаровский край Khabarovsk Territory	7	2,491–2,739
Достоверная идентификация до рода Reliable identification up to the genus	Республика Бурятия Buryat Republic	2	2,202–2,253
	Забайкальский край Trans-Baikal Territory	2	2,243–2,292
	Узбекистан Uzbekistan	1	2,195

Таблица 2 / Table 2

Результаты масс-спектрометрической идентификации свежeweделенных штаммов *F. tularensis*, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока с 2015 по 2021 год (N=83)

The newly *F. tularensis* strains isolated in Siberia and the Far East from 2015 to 2021 (N=83), mass spectrometric identification results

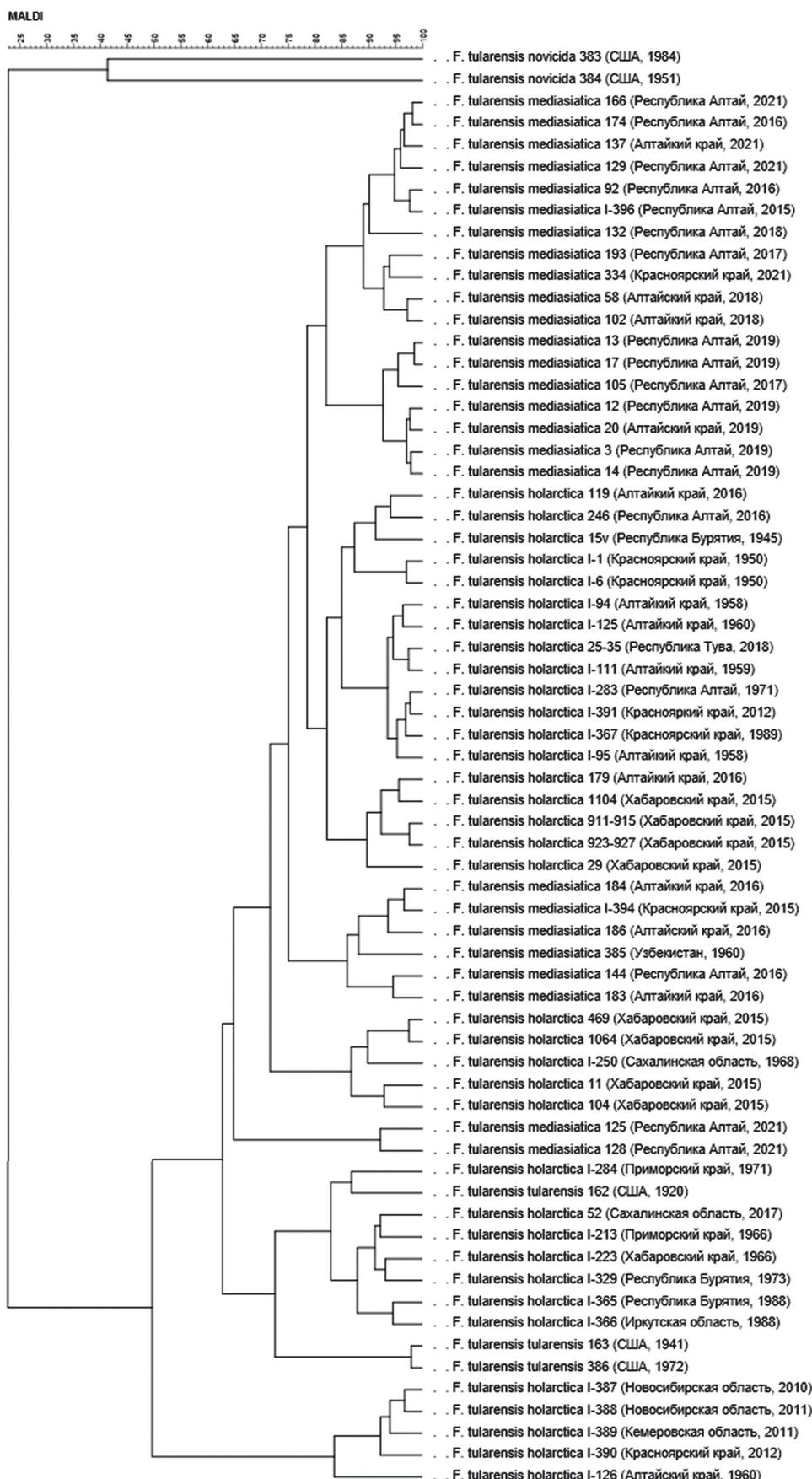
Результат идентификации Identification result	Территория Territory	<i>F. tularensis</i> spp.	Количество исследованных штаммов Number of studied strains	Значение SV SV value
Достоверная идентификация до вида Reliable identification up to the species	Алтайский край Altai Territory	<i>holarctica</i>	8	2,389–2,631
		<i>mediasiatica</i>	10	2,388–2,579
	Красноярский край Krasnoyarsk Territory	<i>mediasiatica</i>	2	2,377–2,452
	Республика Алтай Altai Republic	<i>holarctica</i>	3	2,311–2,633
		<i>mediasiatica</i>	21	2,372–2,620
	Республика Тыва Tyva Republic	<i>holarctica</i>	1	2,559
	Сахалинская область Sakhalin Region	<i>holarctica</i>	1	2,633
Хабаровский край Khabarovsk Territory	<i>holarctica</i>	35	2,380–2,670	
Достоверная идентификация до рода Reliable identification up to the genus	Приморский край Primorsky Territory	<i>holarctica</i>	1	2,240
	Республика Алтай Altai Republic	<i>mediasiatica</i>	1	2,124

родовой принадлежности – 100 %. Данные показатели достаточно высоки и указывают на надежную идентификацию. Однако следует отметить меньшую информативность и точность масс-спектрометрии при изучении коллекционных штаммов. Среди возможных причин может быть неполное восстановление свойств патогена после хранения (длительное хранение в лиофилизированном виде), различные условия культивирования штаммов, которые использованы для дополнения базы данных масс-анализатора и анализируемых штаммов, а также недостаточная представленность референсными спектрами туляремийного микроба, выделенного с определенных территорий, в частности Забайкальского края, Республики Бурятия и ближнего зарубежья. Для преодоления обнаруженных расхождений следует стандартизировать условия культивирования в разных лабораториях, а также дополнить базу данных, инсталлированную в прибор Microflex LT. Вопрос о снижении точности идентификации штаммов после хранения требует дальнейшего уточнения.

Для оценки возможности совершенствования масс-спектрометрии при внутривидовой дифференциации проведен кластерный анализ в программе BioNumerics 7.6. для выборки из 66 спектров *F. tularensis* подвидов *holarctica* (35), *mediasiatica* (26), *tularensis* (3) и *novicida* (2). В данной программе тестировались разные алгоритмы сравнения масс-спектров: как на основе пиков, так и кривых (UPGMA, Ward, Single linkage, Complete linkage). Наилучший результат достигнут с использованием Pearson correlation по алгоритму UPGMA, однако четкого разделения на подвиды добиться не удалось (рисунок), что наглядно демонстрирует сходство белковых профилей разных подвидов туляремийного микроба, по край-

ней мере, после ионизации. В то же время следует отметить, что все штаммы разделились на два кластера. В первый вошли штаммы подвида *novicida*, которые при любых алгоритмах построения филогенетического древа всегда кластеризовались отдельно. Второй кластер включил в себя три остальных подвида, которые в некоторой степени объединились в определенные подгруппы. Можно заключить, что в настоящее время идентификация *F. tularensis* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе Microflex LT по стандартной схеме наиболее надежно достигается до видового уровня, а сложности внутривидового типирования являются ограничением этого метода.

В литературе встречаются исследования, свидетельствующие об успешном применении MALDI-ToF масс-спектрометрии в определении подвида или даже биовара [4–8]. Например, применяя разные условия культивирования и подготовки образцов E. Siebold *et al.* (2010 г.) и O. Karatuna *et al.* (2014 г.) достоверно определили подвиговую принадлежность 45 и 60 штаммов туляремийного микроба соответственно [4, 5]. M.T. Gekenidis *et al.* (2014 г.) путем расщепления белка до трипептических пептидов удалось повысить разрешающую способность дифференцирования сальмонелл до уровня подвидов [6]. Также, используя в качестве матрицы (E)-пропил-циано-4-гидроксицианамилат вместо стандартной (альфа-циано-4-гидроксикоричной) кислоты, удалось достоверно дифференцировать биовары метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного золотистого стафилококка [7]. M.B. Цимбалистова с соавт. (2017 г.), с применением прибора Autoflex speed III (Druker Daltonics, США) и экстракцией белков этиловым спиртом и муравьиной кислотой, обнаружи-



Кластерный анализ спектров штаммов *F. tularensis* в программе BioNumerics v. 7.6 с использованием Pearson correlation по алгоритму UPGMA

The cluster analysis of *F. tularensis* strain spectra in BioNumerics v. 7.6 using “Pearson correlation” and the UPGMA algorithm

ли уникальные пики, характерные для вирулентных штаммов туляремийного микроба [8]. Также имеется более мягкий способ ионизации, оказывающий менее разрушающее воздействие на анализируемое вещество, такой как surface-enhanced laser desorption/ionization (лазерная десорбция/ионизация с усилением поверхности, SELDI-ToF MS) [9], с помощью которого неоднократно проводилась достоверная подвидовая идентификация. Из представленных данных видно, что для повышения разрешающей способности MALDI-ToF масс-спектрометрии авторами чаще всего применялся иной способ подготовки образцов, использовалась другая матрица или прибор с более высокой разрешающей способностью. В итоге, по всей видимости, ими были получены более информативные спектры.

Таким образом, с помощью стандартизованного протокола оценена эффективность видовой идентификации и внутривидовой дифференциации возбудителя туляремии методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. С применением обновленной базы данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper» данный метод в системе лабораторной диагностики туляремии позволяет с высокой надежностью проводить видовую и родовую идентификацию патогена. Для увеличения точности, возможности внутривидовой дифференциации и дальнейшего развития автоматизированной идентификации микроорганизмов, помимо расширения выборки эталонных спектров, необходимо использование приборов нового поколения и применение дополнительных подходов и инструментов анализа.

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

#### Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Шико; 2013. 560 с.
2. 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.
3. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C., Klose K.E., Cheung K.K., Roberts M.J., Ludu J.S., Letendre G.W., Meierovics A.I., Stephens G., Elkins K.L. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J. Bacteriol.* 2004; 186(19):6430–6. DOI: 10.1128/JB.186.19.6430-6436.2004.
4. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Spletstoeser W. 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.
5. Karatuna O., Celebi B., Can S., Akyar I., Kilic S. The use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the identification of *Francisella tularensis*. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2016; 16(2):132–8. DOI: 10.17305/bjbm.2016.894.
6. Gekenidis M.-T., Studer P., Wüthrich S., Brunisholz R., Drissner D. Beyond the matrix-assisted laser desorption ionization

(MALDI) biotyping workflow: in search of microorganism-specific tryptic peptides enabling discrimination of subspecies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(14):4234–41. DOI: 10.1128/AEM.00740-14.

7. Gao W., Li B., Ling L., Zhang L., Yu S. MALDI-TOF MS method for differentiation of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using (E)-Propyl  $\alpha$ -cyano-4-Hydroxyl cinnamylate. *Talanta*. 2022; 244:123405. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123405.

8. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Чайка И.А., Чайка С.О., Водопьянов А.С. Масс-спектрометрический анализ природных и антиген-измененных штаммов туляремийного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 4:92–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-92-96.

9. Seibold E., Bogumil R., Vorderwülbecke S., Al Dahouk S., Buckendahl A., Tomaso H., Spletstoeser W. Optimized application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight MS to differentiate *Francisella tularensis* at the level of subspecies and individual strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2017; 49(3):364–73. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00216.x.

#### References

1. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: Shiko; 2013. 560 p.
2. Balakhonov S.V., Mironova L.V., Afanas'ev M.V., Kulikalova E.S., Ostyak A.S. [MALDI-ToF mass spectrometric identification of pathogen species in improving the epidemiological surveillance of dangerous infectious diseases]. *Bakteriologia [Bacteriology]*. 2016; 1(1):88–94. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-88-94.
3. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C., Klose K.E., Cheung K.K., Roberts M.J., Ludu J.S., Letendre G.W., Meierovics A.I., Stephens G., Elkins K.L. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J. Bacteriol.* 2004; 186(19):6430–6. DOI: 10.1128/JB.186.19.6430-6436.2004.
4. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Spletstoeser W. 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.
5. Karatuna O., Celebi B., Can S., Akyar I., Kilic S. The use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the identification of *Francisella tularensis*. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2016; 16(2):132–8. DOI: 10.17305/bjbm.2016.894.
6. Gekenidis M.-T., Studer P., Wüthrich S., Brunisholz R., Drissner D. Beyond the matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) biotyping workflow: in search of microorganism-specific tryptic peptides enabling discrimination of subspecies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(14):4234–41. DOI: 10.1128/AEM.00740-14.
7. Gao W., Li B., Ling L., Zhang L., Yu S. MALDI-TOF MS method for differentiation of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using (E)-Propyl  $\alpha$ -cyano-4-Hydroxyl cinnamylate. *Talanta*. 2022; 244:123405. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123405.
8. Tsymbalistova M.V., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Chaika I.A., Chaika S.O., Vodop'yanov A.S. [Mass-spectrometric analysis of natural and antigen-altered strains of the tularemia microbe]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (4):92–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-92-96.
9. Seibold E., Bogumil R., Vorderwülbecke S., Al Dahouk S., Buckendahl A., Tomaso H., Spletstoeser W. Optimized application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight MS to differentiate *Francisella tularensis* at the level of subspecies and individual strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2017; 49(3):364–73. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00216.x.

#### Authors:

Syngeeva A.K., Ostyak A.S., Kulikalova E.S., Mazepa A.V., Naumova K.V., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

#### Об авторах:

Сынгеева А.К., Остяк А.С., Куликалова Е.С., Мазепа А.В., Наумова К.В., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.