

М.В.Цимбалистова, Н.В.Павлович, Н.В.Аронова, И.А.Чайка, С.О.Чайка, А.С.Водопьянов

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ И АНТИГЕН-ИЗМЕНЕННЫХ ШТАММОВ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Цель работы. Сравнительное изучение белковых профилей типичных вирулентных и изогенных авирулентных ЛПС-дефектных штаммов туляремии микроба с помощью масс-спектрометрического анализа. **Материалы и методы.** В работе использовали 6 родительских вирулентных (трех основных подвидов) и 8 изогенных авирулентных штаммов *Francisella tularensis*, имеющих различные повреждения в структуре ЛПС. Получение спектров исследуемых культур методом MALDI-TOF MS проводили с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics и программного обеспечения Flex Control, идентификацию – с помощью программы Biotyper, база данных которой была расширена нами ранее внесением масс-спектров 40 типичных штаммов *F. tularensis* трех основных подвидов. **Результаты и выводы.** При оценке влияния пробоподготовки образцов на качество снимаемых спектров с помощью трех методов (экстракция матрицей, ТФУ и этиловым спиртом) показано, что наиболее эффективным является метод обработки бактерий этиловым спиртом и муравьиной кислотой. Согласно полученным данным, типичные вирулентные штаммы туляремии микроба трех основных подвидов имеют существенные различия в мажорных пиках, что позволяет использовать MALDI-TOF MS для проведения подвидовой дифференциации. Вместе с тем при сравнительном изучении белковых спектров вирулентных и авирулентных штаммов *F. tularensis* принципиальных отличий не выявлено. При этом нам удалось обнаружить единичные масс-спектры m/z 4673, 6929, характерные для вирулентных, и m/z 7256 – для авирулентных штаммов. Таким образом, метод MALDI-TOF MS дает возможность достоверно определять подвидовую принадлежность штамма, однако не позволяет проводить дифференциацию штаммов разной степени вирулентности. Результаты выявили, что MALDI-TOF может быть полезным как при идентификации типичных, так и антиген-измененных ЛПС-дефектных штаммов *F. tularensis*.

Ключевые слова: *F. tularensis* трех основных подвидов, авирулентные ЛПС-дефектные мутанты, MALDI-TOF, вирулентность.

Корреспондирующий автор: Павлович Наталья Владимировна, e-mail: tularemia@antiplague.ru.

M.V.Tsimbalistova, N.V.Pavlovich, N.V.Aronova, I.A.Chaika, S.O.Chaika, A.S.Vodop'yanov

Mass Spectrometric Analysis of Natural and Antigen-Modified Strains of Tularemia Agent

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Objective. Comparative study of the protein profiles of typical virulent strains and their isogenic avirulent LPS-defective mutants of *Francisella tularensis* using mass spectrometric analysis. **Materials and methods.** Six typical virulent strains of *F. tularensis* of three main subspecies and eight isogenic avirulent variants which have different lesions in LPS structure were used in this investigation. Protein spectra were obtained by MALDI-TOF MS using mass spectrometer Autoflex speed III Bruker Daltonics and Flex Control software of Biotyper. Earlier we expanded the database by introduction of the mass spectra of 40 typical *F. tularensis* strains of the three main subspecies. **Results and conclusions.** It was shown that the high quality spectrograms were obtained by means of the extraction of bacteria with ethanol supplemented with formic acid, as compared with two other methods (extraction matrix or TFA). According to the data received, the typical virulent strains of tularemia agent of the three main subspecies have significant differences in the major peaks of protein profiles. This suggests that MALDI-TOF MS can be used for the subspecies differentiation of *F. tularensis*. However, a comparative study of the protein spectra of virulent and isogenic avirulent *F. tularensis* strains of the same subspecies did not detect any essential differences. We were able to identify only two individual peaks (m/z 4673, 6929) which were characteristic of all virulent strains and one peak (m/z 7256) – of all avirulent strains. Thus, MALDI-TOF MS allows for reliable determination of the subspecies affiliation of *F. tularensis* strains but does not allow for evaluation of the strains' virulence. The results indicate that MALDI-TOF MS is a useful method for identification of typical and antigen-modified LPS-defective *F. tularensis* strains.

Key words: *F. tularensis* of three main subspecies, LPS-defective avirulent mutants, MALDI-TOF, virulence.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Natalia V. Pavlovich, e-mail: tularemia@antiplague.ru.

Citation: Tsimbalistova 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-Modified Strains of Tularemia Agent. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:92–96. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-92-96

Туляремия относится к опасным инфекционным болезням человека, природные очаги которой широко распространены в северном полушарии Земли. В

Российской Федерации активные эндемичные очаги туляремии зарегистрированы от западных границ до Дальнего Востока и от полуострова Таймыр до юж-

ных границ. Это определяет необходимость постоянного эпидемиологического контроля за состоянием очагов. В то же время полиморфизм клинической картины заболевания, отсутствие настороженности врачей инфекционистов и снижение иммунной прослойки населения увеличивают риск возникновения эпидемических осложнений. Иллюстрацией может служить недавняя вспышка туляремии в Ханты-Мансийске, когда на фоне снижения вакцинации населения заболело более 1000 человек [2].

Нельзя не учитывать и тот факт, что *Francisella tularensis* может быть использована в биотеррористических целях (список А наиболее опасных инфекционных агентов) [12]. При этом потенциальным противником возможно применение вариантов с измененной антигенной структурой, маркерами антибиотикоустойчивости или генетическими модификациями, что существенно осложнит индикацию и идентификацию возбудителя. В связи с вышеперечисленным совершенствование методов лабораторной диагностики туляремии, которые позволят выявлять не только типичные природные штаммы туляремиального микроба, но и бактерии с измененными свойствами, сохраняет свою актуальность.

В настоящее время лабораторная диагностика туляремии базируется как на традиционных (бактериологические, биологические, иммунологические, аллергические), так и современных молекулярно-биологических методах (ПЦР-анализ, иммунохроматографические, протеомные). Однако выделение чистой культуры и идентификация возбудителя трудоемки и требуют нескольких дней, иммунологические методы эффективны не ранее, чем с 7-го дня заболевания. Более того, большинство серологических методов (РА, РНГА, ИФА, ИХ-тесты), основанных на детекции антител против специфических эпитопов ЛПС, становятся малоинформативными при изменении антигенной структуры туляремиального микроба.

Безусловными преимуществами обладают молекулярно-биологические методы – ПЦР- и масс-спектрометрический анализ. Например, ПЦР позволяет в течение 3 ч определить наличие в пробе от 10^2 до 10^3 м.к., включая антиген-измененные штаммы. Вместе с тем присутствие в пробе контаминации (ДНК других бактерий) может приводить к ложноположительным результатам или ингибировать реакцию [8].

MALDI-TOF уже зарекомендовал себя как высокоспецифичный и быстрый метод при идентификации различных микроорганизмов. Так, база данных MALDI-TOF Biotyper включает белковые профили более 4000 видов бактерий. Однако в поставляемой в Российскую Федерацию версии идентификационной базы отсутствуют данные референсных спектров микроорганизмов I–II групп патогенности, в том числе возбудителей чумы, холеры, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы [1]. Более того, масс-спектрометрическому изучению возбудителя туляремии посвящено незначительное количество работ,

которые выполнены, в подавляющем большинстве, на ограниченном наборе типичных природных штаммов [1, 9, 10]. Результаты единичных исследований, посвященных белковому профилированию антиген-измененных вариантов, не позволяют сделать однозначные выводы о возможности использования масс-спектрометрии при их идентификации и оценке вирулентности. В этой связи представляет интерес накопление экспериментальных данных по характеристике белковых профилей более широкого набора антиген-измененных штаммов, что и определило цель настоящего исследования.

Целью исследования было сравнительное изучение белковых профилей типичных вирулентных и изогенных авирулентных ЛПС-дефектных штаммов туляремиального микроба с помощью масс-спектрометрического анализа.

Материалы и методы

В работе использовали 6 родительских вирулентных (трех основных подвидов) и 8 изогенных авирулентных штаммов *F. tularensis*, имеющих различные повреждения в структуре ЛПС, из авторской коллекции д.м.н. Н.В.Павлович. Получение и характеристика антиген-измененных вариантов описаны нами ранее [4]. Все культуры хранились в лиофилизированном состоянии в музее живых культур ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. Бактерии выращивали на специальной плотной среде Т [3].

Изучение антигенных свойств штаммов проводили с помощью РНАт с туляремиальным антигенным эритроцитарным диагностикумом (производства ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора) согласно рекомендациям МУК 4.2.2939-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней».

Вирулентность бактерий изучали на модели беспородных белых мышей, зараженных 10^1 – 10^8 м.к./мышь, по соотношению павших животных к выжившим.

Получение спектров исследованных культур методом MALDI-TOF масс-спектрометрии проводили с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics (Германия) и программного обеспечения Flex Control, идентификацию – с помощью программы Biotyper, база данных которой была расширена нами ранее внесением масс-спектров 40 типичных штаммов *F. tularensis* трех основных подвидов (государственная регистрация базы данных № 2014621080 от 04.08.2014 г.).

Для оценки влияния пробоподготовки на качество получаемых спектров образцы из авирулентных антиген-измененных штаммов экстрагировали с помощью 3 методов: экстракция органическим растворителем (α -циано-гидроксикоричная кислота, мат-

рица), ТФУ и этанолом/муравьиной кислотой. Во всех случаях в качестве матрицы использовали α-циано-гидроксикоричную кислоту. Пробоподготовку образцов вирулентных штаммов (II группа патогенности) проводили методом экстракции этиловым спиртом и муравьиной кислотой в соответствии с рекомендациями МР 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности».

Конвертацию полученных raw-файлов проводили с использованием программы ProteoWizard [6], нормализацию и выравнивание пик-листов – с помощью программы MassUp [11]. Построение дендрограммы проводили с использованием программы MALDI-Tree (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора). При этом соседние пики, отличающиеся на 3 и менее m/z, расценивали как один и тот же пик.

Результаты и обсуждение

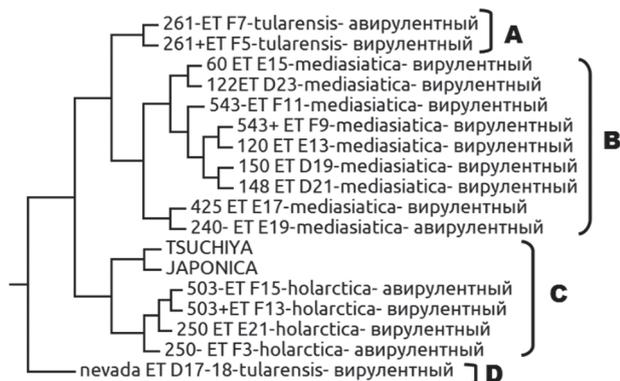
Проведенное нами ранее исследование свойств антиген-измененных штаммов показало, что, в отличие от родительских вирулентных штаммов туляремийного микроба, 6 из 8 вариантов не вступали в реакцию с туляремийным антигенным эритроцитарным диагностикумом (РНАт) ($\geq 10^8$ м.к./мл) и не вызывали гибель лабораторных животных при больших дозах заражения ($DCL \geq 10^6$ м.к.). Эти штаммы синтезировали R-ЛПС, полностью лишенный O-полисахаридной цепи. Два из 8 антиген-измененных штаммов взаимодействовали с диагностикумом в РНАт (10^{7-8} м.к./мл), однако характеризовались сниженной вирулентностью для белых мышей ($DCL - 10^4 - 10^5$ м.к.). При этом они обладали дефектным S-ЛПС, отличающимся по частотному распределению и электрофоретической подвижности от S-ЛПС родительских типичных штаммов.

С целью оценки влияния методов пробоподготовки на качество снимаемых спектров использовали экстракцию белков из авирулентных вариантов

с помощью органического растворителя (матрица), ТФУ или этилового спирта/муравьиной кислоты. Сравнительный анализ показал, что наиболее качественные спектры получены при спиртовой экстракции. В частности, именно этот метод обеспечивал максимальное количество четких пиков. Подтверждением могут служить дендрограммы штаммов, обработанных разными методами, когда именно экстракция этиловым спиртом приводила к четкому распределению штаммов на четыре кластера, соответствующие трем основным подвидам с высоким уровнем достоверности (Score $\geq 2,3$), рисунок. Интересно, что один штамм, относящийся по биологическим и биохимическим свойствам к *F. tularensis subsp. tularensis*, образовывал отдельный кластер. В случае использования других методов пробоподготовки столь четких результатов не получено. Наши результаты согласуются с данными M.Drevinek *et al.* (2012), которые продемонстрировали, что максимальный выход белков при наилучшем соотношении уровня сигнал/шум в отношении возбудителей чумы, сапа, мелиоидоза, туляремии и бруцеллеза обеспечивает именно экстракция этиловым спиртом и муравьиной кислотой [7].

Следующий этап исследования включал сравнительное изучение белковых профилей типичных и антиген-измененных штаммов возбудителя туляремии. Как установлено, вне зависимости от структуры ЛПС (родительский S-, мутантный R или дефектный S-ЛПС) все исследованные вирулентные и авирулентные штаммы характеризовались идентичными белковыми профилями с незначительными индивидуальными различиями по пикам малой интенсивности. Анализ полученных белковых профилей вирулентных и авирулентных ЛПС-дефектных штаммов туляремийного микроба суммирован в таблице.

Согласно полученным данным, типичные вирулентные штаммы туляремийного микроба трех основных подвидов имеют существенные различия в мажорных пиках, что позволяет использовать MALDI-TOF MS для проведения подвидовой дифференциации. Вместе с тем при сравнительном изучении белковых спектров вирулентных и авирулентных штаммов *F. tularensis* принципиальных отличий не выявлено. При этом нам удалось обнаружить единич-



Дендрограмма, полученная на основе кластерного анализа образцов с обработкой этиловым спиртом и муравьиной кислотой

Сравнительный анализ пиков высокой интенсивности у штаммов туляремийного микроба, отличающихся по подвидовой принадлежности и уровню вирулентности для лабораторных животных

Штаммы <i>F. tularensis</i> трех основных подвидов	Пики, m/z
<i>subsp. tularensis</i> (AE-261 cap ⁺ , вирулентный)	5767, 5810, 6580, 8104, 11532
<i>subsp. holarctica</i> (503 cap ⁺ , вирулентный)	2748, 3338, 3438, 4452, 5145, 5243, 5312, 5555, 6610, 8904, 10289, 13217
<i>subsp. mediasiatica</i> (543 cap ⁺ , вирулентный)	2030, 2440, 2473, 2553, 3120, 3231, 3274, 3862, 4393, 4517, 4929, 6707, 7326, 7348, 8961
Штаммы Cap ⁺ (вирулентные)	4673, 6929
Штаммы Cap ⁻ (авирулентные)	7256

ные масс-спектры m/z 4673, 6929, характерные для вирулентных, и m/z 7256 – для авирулентных штаммов. Нельзя исключить, что они коррелируют со степенью вирулентности возбудителя туляремии, однако это предположение нуждается в подтверждении с использованием других программ для анализа белков с помощью масс-спектрометрического анализа.

Результаты проведенного исследования показали, что метод MALDI-TOF может быть использован при идентификации как типичных, так и антиген-измененных штаммов туляремийного микроба, имеющих повреждения в структуре ЛПС.

Таким образом, в настоящее время отсутствуют достоверные сведения о возможности циркуляции в природных очагах антиген-измененных вариантов возбудителя туляремии с ослабленной патогенностью. Однако активность эндемичных очагов в течение длительного времени не позволяет исключить вероятность существования подобных вариантов в природе (например, в межэпизоотийный период). При этом использование наиболее широко применяемых в эпизоотологических обследованиях традиционных методов (бактериологического, серологического или биологического) является малоэффективным. Поэтому для совершенствования эпидемического надзора за туляремией необходимо внедрение новых методов, позволяющих идентифицировать как типичные, так и атипичные штаммы *F. tularensis*. Одним из таких современных методов может быть идентификация бактерий по профилям наиболее консервативных рибосомальных белков с помощью MALDI-TOF. Вместе с тем в литературе мы встретили единственную работу по масс-спектрометрическому изучению аттенуированных мутантов штамма *F. tularensis* Schu4, дефектных по различным генам синтеза ЛПС. Как было показано, такие штаммы имели либо идентичный с родительским белковый профиль, либо незначительное снижение высоты основных пиков в зависимости от локализации мутаций [13]. В нашей работе мы провели сравнительный анализ масс-спектров коллекции из 8 изогенных ЛПС-дефектных (с различными повреждениями структуры ЛПС) и родительских вирулентных штаммов трех основных подвидов. Как установлено, наиболее эффективным методом пробоподготовки для возбудителя туляремии является экстракция этиловым спиртом/муравьиной кислотой. Выявлено, что вне зависимости от подвиговой принадлежности, степени повреждения ЛПС (дефектный S или R-хемотип) и степени аттенуации все измененные варианты возбудителя характеризовались сходным белковым профилем и идентифицированы как *F. tularensis* соответствующего подвида. Следовательно, внедрение в практику эпизоотологического обследования окружающей среды масс-спектрометрического анализа позволит расширить возможность обнаружения антиген-измененных культур возбудителя, уклоняющихся от традиционных методов лабораторной диагностики туляремии.

Полученные в настоящей работе результаты подтверждают сделанные нами ранее выводы о важной роли ЛПС в реализации патогенных свойств туляремийного микроба [5]. Можно предположить, что различия у вирулентных и авирулентных штаммов касаются не качественной композиции белков, а их, по-видимому, различной функциональной активности. Нельзя исключить также, что существенное значение при этом имеет полноценный ЛПС, представляющий белки в наиболее функционально активной форме. Однако этот вывод нуждается в более углубленном исследовании.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Балахонов С.В. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ для идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2015; 33(2):3–8. DOI: 10.3103/S0891416815020020.
2. Мещерякова И.С., Добровольский А.А., Демидова Т.Н., Кормилицына М.И., Михайлова Т.В. Трансмиссивная эпидемическая вспышка туляремии в г. Ханты-Мансийске в 2013 году. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика.* 2014; 5(78):14–20.
3. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis*. *Антибиотики и мед. биотехнол.* 1987; 32(2):133–7.
4. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н., Шиманюк Н.Я., Рыжкова В.В., Данилевская Г.И., Михалевич Р.В. Характеристика биологических свойств бескапсульных вариантов *Francisella tularensis*. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1993; 3:21–30.
5. Павлович Н.В., Тынянова В.И. Возможные механизмы реализации токсического потенциала липополисахаридов патогенных бактерий. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2005; 2:9–12.
6. Chambers M.C., Maclean B., Burke R., Amodei D., Ruderman D.L., Neumann S., Gatto L., Fischer B., Pratt B., Egertson J., Hoff K., Kessner D., Tassman N., Shulman N., Frewen B., Baker T.A., Brusniak M.Y., Paulse C., Creasy D., Flasher L., Kani K., Moulding C., Seymour S.L., Nuwaysir L.M., Lefebvre B., Kuhlmann F., Roark J., Rainer P., Detlev S., Hemenway T., Hühner A., Langridge J., Connolly B., Chadick T., Holly K., Eckels J., Deutsch E.W., Moritz R.L., Katz J.E., Agus D.B., MacCoss M., Tabb D.L., Mallick P. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30:918–20. DOI: 10.1038/nbt.2377.
7. Drevinek M., Dresler J., Klimentova J., Pisa L., Hubalek M. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 2012; 55(1):40–4. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03255.x.
8. Jiang J.J., Parker C.E., Fuller J.R., Kawula T.H., Borchers C.H. An Immunoaffinity tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for detection of *Francisella tularensis*. *Anal. Clin. Acta.* 2007; 605(1):70–9.
9. Karatuna O., Celebi B., Can S., Akyar I., Kiliç 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: org/10.17305/bjbm.2016.894.
10. Lai X.H., Zhao L.F., Chen X.M., Ren Y. Rapid identification and characterization of *Francisella* by molecular biology and other techniques. *Open Microbiol. J.* 2016; 10(suppl. 1):64–77. DOI: 10.2174/1874285801610010064.
11. López-Fernández H., Santos H.M., Capelo J.L., Fdez-Riverola F., Glez-Peña D., Reboiro-Jato M. Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. *BMC Bioinformatics.* 2015; 16:318. DOI: org/10.1186/s12859-015-0752-4.
12. McLendon M.K., Apicella M.A., Allen L-A.H. *Francisella tularensis* taxonomy, genetics and immunopathogenesis of potential agent of biowarfare. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006; 60:167–185. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142126.
13. Twine S., Vinogradov E., Lindgren H., Sjostedt A., Conlan J. Roles for wbtC, wbtL, and kdtA genes in lipopolysaccharide biosynthesis, protein glycosylation, virulence, and immunogenicity in *Francisella tularensis* strain SCHU S4. *Pathogens.* 2012; 1:12–29. DOI: 10.3390/pathogens1010012.

References

1. Afanas'ev M., Mironova L., Balakhonov S. [MALDI-TOF mass-spectrometric analysis for identification of plague agent, cholera and tularemia agents]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2015; 33(2):3–8. DOI: 10.3103/S0891416815020020.
2. Meshcheryakova I.S., Dobrovolsky A.A., Demidova T.N., Kormilitsyna M.I., Mikhailova T.V. [Transmissible epidemic outbreak of tularemia in 2013 in Khanty-Mansiysk]. *Epidemiol. Vaksinoprof.* 2014; 5(78):14–20.
3. Pavlovich N.V., Mishan'kin B.N. [Transparent nutrient medium for *Francisella tularensis* cultivation]. *Antibiotiki i Med. Biotekhnol.* 1987; 32(2):133–7.
4. Pavlovich N.V., Mishan'kin B.N., Shimanyuk N.Ya., Ryzhkova V.V., Danilevskaya G.I., Mikhalevich R.V. [Characteristics of biological properties of acapsular *Francisella tularensis* variants]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1993; 3:21–30.
5. Pavlovich N.V., Tynyayana V.I. [Possible mechanisms of toxic lipopolysaccharides potential realization of pathogenic bacteria]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2005; 2:9–12.
6. Chambers M.C., Maclean B., Burke R., Amodei D., Ruderman D.L., Neumann S., Gatto L., Fischer B., Pratt B., Egerton J., Hoff K., Kessner D., Tasman N., Shulman N., Frewen B., Baker T.A., Brusniak M.Y., Paulse C., Creasy D., Flashner L., Kani K., Moulding C., Seymour S.L., Nuwaysir L.M., Lefebvre B., Kuhlmann F., Roark J., Rainer P., Detlev S., Hemenway T., Huhmer A., Langridge J., Connolly B., Chadick T., Holly K., Eckels J., Deutsch E.W., Moritz R.L., Katz J.E., Agus D.B., MacCoss M., Tabb D.L., Mallick P. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30:918–20. DOI: 10.1038/nbt.2377.
7. Drevinek M., Dresler J., Klimentova J., Pisa L., Hubalek M. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 2012; 55(1):40–4. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03255.x.
8. Jiang J.J., Parker C.E., Fuller J.R., Kawula T.H., Borchers C.H. An Immunoaffinity tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for detection of *Francisella tularensis*. *Anal. Clin. Acta.* 2007; 605(1):70–9.
9. Karatuna O., Çelebi B., Can S., Akyar I., Kiliç 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: org/10.17305/bjbm.2016.894.
10. Lai X.H., Zhao L.F., Chen X.M., Ren Y. Rapid identification and characterization of *Francisella* by molecular biology and other techniques. *Open Microbiol. J.* 2016; 10(suppl. 1):64–77. DOI: 10.2174/1874285801610010064.
11. López-Fernández H., Santos H.M., Capelo J.L., Fdez-Riverola F., Glez-Peña D., Reboiro-Jato M. Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. *BMC Bioinformatics.* 2015; 16:318. DOI: org/10.1186/s12859-015-0752-4.
12. McLendon M.K., Apicella M.A., Allen L.-A.H. *Francisella tularensis* taxonomy, genetics and immunopathogenesis of potential agent of biowarfare. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006; 60:167–185. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142126.
13. Twine S., Vinogradov E., Lindgren H., Sjostedt A., Conlan J. Roles for wbtC, wbtI, and kdtA genes in lipopolysaccharide biosynthesis, protein glycosylation, virulence, and immunogenicity in *Francisella tularensis* strain SCHU S4. *Pathogens.* 2012; 1:12–29. DOI: 10.3390/pathogens1010012.

Authors:

Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Chaika I.A., Chaika S.O., Vodopyanov A.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Цимбалистова М.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Чайка И.А., Чайка С.О., Водопьянов А.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 20.04.17.