

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ

Ростовский-на Дону научно-исследовательский противочумный институт

Токсины — высокомолекулярные соединения, образуемые микроорганизмами, животными, растениями и обладающие антигенными свойствами. В последнее время в связи с возникшей угрозой террористических действий идентификация ряда бактериальных токсинов становится особенно актуальной. Новый подход в идентификации токсинов связан с развитием масс-спектрометрии и позволяет успешно проводить анализ большинства природных токсинов. Метод MALDI-MS позволяет проводить детекцию таких токсинов, как Shiga-toxin *Escherichia coli*, delta-toxin *Staphylococcus aureus*, цитотоксин *Bacillus cereus*, ботулинический нейротоксин, холерный токсин. Аналитические и диагностические характеристики метода, простота и скорость исследования свидетельствуют о перспективе внедрения метода в практику лабораторной диагностики при определении токсинопродукции исследуемых микроорганизмов.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 93—101

Ключевые слова: MALDI-MS спектрометрический анализ, времяпролетная масс-спектрометрия, бактериальные токсины, матрица, калибратор, Mascot, идентификация

M.V.Poleeva, O.S.Chemisova

THE USE OF MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS FOR THE DETECTION OF BACTERIAL TOXINS

Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

Toxins — molecular weight compounds produced by microorganisms, animals, plants and possessing antigenic properties. Recently due to the perceived threat of terrorist actions identification of a number of bacterial toxins is especially important. A new approach in the identification of toxins associated with the development of mass spectrometry and can be successfully used for analysis of most environmental toxins. The method of MALDI-MS allows the detection of toxins such as Shiga-toxin *Escherichia coli*, delta-toxin of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* particular, botulinum neurotoxin, cholera toxin. Analytical and diagnostic characteristics of the method, the simplicity and speed studies indicate the long term implementation of a method in the practice of laboratory diagnostics in determining toxinproducing of the studied microorganisms.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 93—101

Key words: MALDI-MS spectrometric analysis, time-of-flight mass spectrometry, bacterial toxins, matrix, calibrant, Mascot, identification

Токсины — высокомолекулярные соединения, образуемые микроорганизмами, животными, растениями, обладающие антигенными свойствами и сильным токсическим действием на человеческий организм. Наиболее токсичными являются бактериальные токсины. К сильным токсинам, продуцируемым микроорганизмами, относятся ботулинический, столбнячный, холерный токсины [14]. Они определяют основные симптомы инфекционных болезней человека и животных, а также рассматриваются в качестве биологического оружия [6, 39].

Большинство биологических токсинов имеют полипептидную природу, однако известны и низкомолекулярные соединения, имеющие высокую токсичность [16, 18, 33]. Большая часть токсинов представляют собой А-В структуру, что предполагает наличие двух компонентов — В-субъединицы, которая участвует в связывании токсина с рецептором на поверхности клетки хозяина и способствует транспортировке токсина в клетку хозяина; и А-субъединицы — проявляющей энзиматическую (токсическую) активность в клетке хозяина. Структура В-доменов зависит от структуры рецепторов-мишеней, с которыми взаимодействует токсин. А-субъединицы более консервативны, чем В, особенно в участках, критических для их ферментативной активности [11, 20].

Идентификация токсинов в различных средах — одна из наиболее сложных задач в аналитической токсикологии. В последнее время из-за возникшей угрозы террористических действий детекция ряда бактериальных токсинов в связи с их потенциальной опасностью становится особенно актуальной. Для идентификации и анализа токсинов используются различные лабораторные методы, включающие тесты на животных, микробиологические методы, ПЦР-анализ, иммунологические методы. Все эти методы не лишены недостатков [15, 28, 29].

О масс-спектрометрии (МС) как о методе исследования биологических образцов заговорили с появлением так называемых мягких методов ионизации: электрораспыления и лазерной десорбции на матрице (MALDI — Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, матрично активированная лазерная десорбция/ионизация) [10, 12]. Масс-спектрометрия — метод исследования вещества, основанный на определении отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации представляющих интерес компонентов пробы. Совокупность значений m/z и относительных величин токов этих ионов, представленная в виде графика, называется масс-спектром вещества [6, 7, 21, 25, 26]. Широкое применение в задачах идентификации белков по массам пептидов, входящих в их состав, нашли времяпролетные масс-спектрометры (TOF) с источником ионизации MALDI.

С развитием масс-спектрометрии связан и новый подход в идентификации токсинов, что позволяет успешно анализировать термолабильные нелетучие соединения, к которым и относится большинство природных токсинов. Основное преимущество метода MALDI-MS состоит в том, что этим методом можно определять молекулярные массы цельных белков без предварительного расщепления на пептиды. Несмотря на то, что некоторые белки отсутствуют в базах данных, используемый метод сравнения аминокислотных последовательностей, определенных в ходе исследования (например, тандемный MS-MS анализ), с последовательностями уже определенных белков позволяет если не идентифицировать белки, то хотя бы определить их класс [6].

Характер масс-спектров сильно зависит от многих параметров: природы матрицы, способа приготовления образца, количественного соотношения матрица/анализируемое соединение, длины волны, долготы импульса и мощности лазерного излучения. Поэтому анализ каждого типа соединений требует оптимального подбора многих этих параметров [9].

Матрица MALDI — нелетучий твердый материал, обеспечивающий процессы десорбции и ионизации посредством поглощения лазерного излучения. Как результат, и матрица, и любой образец, встроенный в нее, испаряется. Матрица также служит для того, чтобы минимизировать ущерб образцу от лазерного излучения путем поглощения большей части падающей энергии [21, 26].

Основные требования к материалу матрицы заключаются в его высокой способности поглощать лазерное излучение; кристаллизоваться с включением в структуру молекул анализируемого вещества; инертности по отношению к анализируемому веществу; хорошей растворимости в растворителях, используемых для растворения образца, низкой летучести в условиях вакуума. Матрицы обладают селективностью и по отношению к классу анализируемых соединений. Во многом это определяется различной природой механизмов образования ионов анализируемого вещества. Чаще всего в качестве матриц используются твердотельные (в виде порошков) слабые органические кислоты. Растворитель также играет очень важную роль в процессе подготовки образца для анализа. Он должен одинаково хорошо растворять как матрицу, так и анализируемое вещество. Разная растворимость компонентов приводит к их дробной кристаллизации, что является абсолютно неприемлемым для проведения анализа [5, 6, 21, 25].

Наиболее широкое в качестве матриц применение нашли: синапиновая кислота (sinapic acid) — для исследования пептидов и больших протеинов с молекулярной массой 10 — 150 кДа, в качестве растворителя используются тетрагидрофуран, диметилформамид; альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) — для пептидов с массой менее 10 кДа, липидов и углеводов, растворители — ацетон, ацетонитрил, тетрагидрофуран, диметилформамид, этанол; 2,5-дигидроксibenзойная кислота (2,5-dihydroxybenzoic acid) — для пептидов, протеинов, углеводов, олигонуклеотидов, полимеров и других органических молекул, в качестве растворителя используются вода, этанол, метанол, ацетон, ацетонитрил, хлороформ, тетрагидрофуран.

Также в качестве матрицы могут использоваться: 2-(4-гидроксифенилазо)-бензойная кислота (2-(4-hydroxyphenyazo)-benzoic acid) — для исследования пептидов, белков, синтетических полимеров, растворители — диоксан, ацетон, тетрагидрофуран, диметилформамид; феруловая кислота (ferulic acid) — для пептидов, белков, растворители — тетрагидрофуран, диметилформамид.

Для успешного проведения анализа необходимо правильно выбрать не только матрицу, но и растворитель, а также соотношение между матрицей и анализируемым веществом — чем выше молекулярная масса анализируемого вещества, тем больше матрицы нужно использовать. Очень важно, чтобы кристаллизация матрицы и анализируемого вещества проходила одновременно, сопровождаясь встраиванием молекул анализируемого вещества в кристаллы матрицы, что является необходимым условием получения хорошо разрешимого спектра [5]. Обычно раствор матрицы в подходящем растворителе готовится ежедневно, поскольку он светочувствителен и подвержен фото-разложению, но может храниться короткое время в защищенном от света месте.

Калибрانت. Для получения точных и достоверных результатов любое аналитическое оборудование требует настройки и калибровки. Для калибровки масс-спектрометров применяются определенные стандарты. Выбор стандарта зависит от диапазона работы прибора и знака анализируемых ионов. Для калибровки в области от 2 до 15 кДа удобно использовать стандарты полимеров с заранее известными концевыми группами. Основной задачей при калибровке является правильное соотношение сигналов на начальной стадии. Для этого могут помочь стандарты на основе протеинов. Так, для увеличения достоверности анализа системы Biotyper используется калибровочный бактериальный стандарт, представляющий собой смесь белков E.coli DH5 α с добав-

лением двух белков крупной массы. Калибровка происходит в диапазоне масс от 4 до 17 кДа.

Пробоподготовка. Существует несколько методик нанесения образца на мишень. Чаще всего аналит и матрицу тщательно перемешивают в отдельной емкости и затем совместно наносят на мишень. Кроме того, можно наносить на мишень последовательно сначала матрицу, а потом аналит, и наоборот — сначала аналит, затем матрицу. Разработаны методики и имеются готовые коммерчески доступные микроколоники (например, ZipTip фирмы «Millipore», Supel-Tips фирмы «Supelco») для одновременного обессоливания образца и нанесения его на мишень. Процедура включает в себя такие стадии, как нанесение образца на колонку, промывку водой и элюирование аналита прямо на мишень. Стоит отметить, что эта процедура также позволяет концентрировать анализируемые вещества [6].

Перед анализом важно очистить анализируемый белок от примесных компонентов, что достигается методами хроматографии. Необходимо отметить, что в настоящее время разработаны устройства, позволяющие совместить MALDI масс-спектрометр с жидкостным хроматографом, что позволяет проводить определение белков в их смесях в режиме рутинных анализов [5].

При масс-спектрометрическом анализе белков различают несколько подходов: «top-down» — получение информации на основе масс-спектрометрического анализа целых, неповрежденных белковых молекул. Недостатком метода является селективность, поскольку для каждой массы белка можно подобрать множество белков-кандидатов с такой массой [37]; «bottom-up» — восстановление информации о белках за счет анализа отдельных пептидов этих белков; «middle-down» — недавно возникший подход, основанный на неполном протеолизе исходного белка с последующим масс-спектрометрическим анализом данных длинных пептидов методом «top-down» [35].

Наиболее широко распространенным вариантом анализа белков стал подход «bottom-up». Он представляет собой предварительное биохимическое расщепление белка на более мелкие пептиды, очистку полученного образца от низкомолекулярных примесей и масс-спектрометрический анализ смеси. Чаще всего для пробоподготовки в масс-спектрометрии используется трипсин. В результате триптического гидролиза получается набор от 10 до 100 и более пептидов массой 500 — 4000 дальтон. В некоторых случаях используются и другие агенты избирательного гидролиза (пепсина, химоотрипсина, эластазы и др.). Таким образом, объектом масс-спектрометрического анализа становится смесь пептидов, являющихся фрагментами исходных белков [8, 23]. Для каждого из белков набор пептидов, полученных в результате ферментативного гидролиза, уникален, соответственно набор молекулярных масс пептидов гидролизата является характеризующим параметром для идентификации белка [2, 34].

Регистрация масс-спектров. Следующий этап — регистрация масс-спектра полученной смеси, в результате чего получается набор или список молекулярных масс. Он не дает никакой информации о структуре или других свойствах продуктов. В основе метода только предположение, что это молекулярные массы пептидов, и эти пептиды образовались в результате специфического гидролиза. Здесь и заключается главная идея подхода — если каждый белок имеет свой набор пептидов и соответствующий ему перечень молекулярных масс, то вполне возможно и решение обратной задачи — найти для полученного перечня молекулярных масс соответствующий ему белок [Курова В.С. и др., 2009].

Белковые базы данных. Для использования в различных средствах анализа масс-спектрометрических данных существуют белковые базы данных. Наиболее распространенными поисковыми системами являются Mascot, OMSSA и др. [1]. Во всех системах идентификация осуществляется по полученным исследователем масс-спектрометрическим данным, путем их сопоставления с известными структурами белков.

Например, поисковая программа Mascot проводит поиск и идентификацию белков по базам данных первичных последовательностей белков и соответствующих генов. Принцип работы Mascot основан на алгоритме MOWSE (MOlecular Weight SEarch), разработанном в 1993 году D.J.Pappin [31]. Первым этапом поиска с использованием алгоритма MOWSE является сравнение вычисленных масс пептидов для всех записей последовательностей в базе данных. Каждая вычисленная величина, которая совпадает с заданной погрешностью с экспериментальной величиной, считается как совпавшая. Молекулярная масса интактного белка может быть использована как пре-фильтр. Вместо простого счета числа совпавших пептидов MOWSE-алгоритм использует эмпирически определенные факторы, чтобы приписывать статистический вес каждому совпавшему пептиду [1].

Диалоговое окно программы Mascot позволяет указать базу данных для поиска, способ фрагментации белка (химический или ферментативный гидролиз) и возможные модификации аминокислотных остатков (заданные или теоретически возможные в данных условиях). Также можно оптимизировать поиск, выбрав биологический таксон, указав предположительную массу искомого белка и установив точность, с которой экспериментальные данные должны соответствовать теоретическим. Далее, загрузив список экспериментальных масс и зарядовых состояний ионов, можно начать поиск. Программа Mascot позволяет обращаться к различным базам данных, наиболее универсальными из которых являются MSDB, NCBI, SwissProt и dbEST [Курова В.С. и др., 2009].

Идентификация бактериальных токсинов. Основной проблемой в идентификации отдельных молекул, например, токсинов, является их низкая продукция в условиях *in vitro* и, как следствие, низкая интенсивность пиков относительно других белковых молекул — примесей. Также зачастую по значению молекулярной массы невозможно идентифицировать белок, т. к. большое количество белков обладает близкими по значению молекулярными массами; также встречаются фрагменты белков — пептиды — с одинаковыми последовательностями, которые могут принадлежать совершенно разным белкам. В последнее время появляется все больше работ, посвященных идентификации токсинов биологического происхождения, в которых авторы предлагают различные подходы к решению этих проблем [13, 17, 19, 22, 24, 27, 30, 32].

С.К.Fagerquist et al. разработан метод для определения α -субъединицы Shiga-toxin 2 (α -Stx2) энтерогеморрагических штаммов *E. coli* O157:H7 с использованием MALDI-TOF MS. На этапе пробоподготовки проводили лизис клеток бактериофагом, что позволило повысить степень обнаружения STX по сравнению с механическим лизисом [19].

S.Kull et al. была показана возможность использования MALDI для одновременного выявления рицина, стафилококкового энтеротоксина и ботулинического нейротоксина. Предлагаемый авторами метод позволяет определять указанные токсины в смешанных образцах в таких субстратах, как молоко или сок. Метод включает в себя этап аффинного обогащения с использованием

специфических моноклональных антител к каждому из токсинов с последующей идентификацией MALDI-TOF MS. Чувствительность метода составила 500 fmol для каждого из токсинов [27].

J.Gagnaire et al. (2012) метод MALDI-TOF MS был использован для детекции delta-toxin *Staphylococcus aureus*. Авторы оценивали наличие пика, соответствующего delta-toxin, используя очищенный токсин, природные штаммы, а также мутантные по гену, кодирующему токсин. Был определен пик, соответствующий значению m/z 3005 ± 5 и показана возможность анализа цельноклеточных препаратов (одной колонии микроорганизма, выращенной на плотной питательной среде) в MALDI-TOF MS для рутинной идентификации основного фактора патогенности *S. aureus*.

Bacillus cereus продуцируют такие токсины, как цитотоксин K1 (CytK1) и Non-энтеротоксин гемолитический (NHE), способные вызывать пищевые отравления у людей. Обнаружение данных токсинов затруднено, и бельгийские ученые применили метод MALDI-TOF MS и показали, что он может быть успешно использован для выявления указанных токсинов. На этапе пробоподготовки проводили предварительную трипсинизацию [36].

J.R.Barr et al. был разработан высокочувствительный и быстрый метод MALDI-TOF MS, позволяющий выявлять специфические продукты расщепления для каждого серотипа токсина (A, B, E и F). В работе использовался очищенный токсин, обработанный трипсином [14]. Возможность использования методов жидкостной хроматографии — масс-спектрометрии и tandemной масс-спектрометрии для детекции ботулинического токсина была также показана в [24, 38, 39].

Цианобактерии синтезируют в основном цианотоксины двух типов — нейротоксины и гепатотоксины. Надежность определения присутствия цианотоксинов достигается сочетанием метода жидкостной хроматографии и метода масс-спектрометрии, которое дает точные значения молекулярных масс, характеризующих определяемые соединения. Для экстракции внутриклеточных токсинов из образцов биомассы необходимо разрушение клеточной стенки бактерий, что достигается либо лиофилизацией, либо многократным замораживанием-размораживанием образца с последующей экстракцией. В данном случае лиофилизат биомассы известной навески экстрагировали двумя порциями комплексного элюента (ацетонитрил-вода-ТФУ) при помощи ультразвука. Полученный экстракт центрифугировали и анализировали. Таким образом, авторами разработан и апробирован высокоселективный чувствительный метод определения цианотоксинов в природной воде, основанный на жидкостной хроматографии — масс-спектрометрии высокого разрешения [Русских Я.В. и др.].

Сотрудниками РосНИПЧИ «Микроб» была проведена индикация холерного токсина с помощью MALDI масс-спектрометрии. Использовали очищенный холерный токсин, полученный из штамма *Vibrio cholerae* 569B. Супернатант, содержащий холерный токсин, наносили на планшет MALDI в количестве 0,5 мкл, в качестве матрицы использовали 10 мг/мл α -циано-4-гидроксикоричной кислоты. В результате проведенного исследования был определен масс-спектр холерного токсина и выявлены специфические пики. На основании полученных данных выделены маркеры (спектральные пики с определенным значением m/z), соответствующие коммерческому препарату холерного токсина (значения m/z 2899 ± 1 , 3868 ± 1 , 5803 ± 4 , 7738 ± 6 , 11603 ± 7). Спектральный пик с m/z , равным 11603 ± 7 , предположительно, соответствовал

мономеру В-субъединицы холерного токсина с молекулярной массой ~11,6 кДа. Использовать данный метод можно для индикации токсинов в объектах окружающей среды при наработке базы данных токсинов биологического происхождения [3, 4].

Интенсивное развитие технологий анализа биологических объектов, в частности создание спектра методов обнаружения и расшифровки структуры природных биополимеров, таких как белки, молекулы ДНК, РНК, существенно расширили возможности в исследовании микроорганизмов. Технология MALDI-MS позволяет не только повысить точность видовой идентификации микроорганизмов, но и успешно проводить детекцию большинства природных токсинов. Аналитические и диагностические характеристики метода, простота и скорость исследования свидетельствуют о перспективе внедрения метода в практику лабораторной диагностики при определении токсинопродукции исследуемых микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автономов Д. М., Агрон И. А., Кононихин А. С., Николаев Е. Н. Создание базы данных точных массово-временных меток для качественного и количественного подхода в исследовании протеома мочи человека с использованием изотопного мечения. Труды МФТИ. 2009, 1: 24-29.
2. Беризовская Е.И., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Митрофанов Д.А., Удинцев А.В., Аксенов А.В., Шевлякова О.А., Родин И.А., Шпигун О.А. Методы обработки масс-спектрометрических данных при идентификации пептидов и белков. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015, 5: 266-278.
3. Германчук В.Г., Уткин Д.В., Спицын А.Н., Киреев М.Н., Щербакова Н.Е. Индикация холерного токсина с помощью MALDI масс-спектрометрии. ЗНИСО. 2015, 3 (264): 28-31.
4. Германчук В.Г., Уткин Д.В., Спицын А.Н., Михеева Е.А., Осина Н.А. Применение методов спектроскопического анализа для выявления холерного токсина. ЗНИСО. 2016, 6 (279): 40-43.
5. Гришин И.Д. Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для анализа высокомолекулярных и металлоорганических соединений. Электронное учебно-методическое пособие. Нижний Новгород, 2014.
6. Дубровский Я. А., Подольская Е. П. Определение токсинов пептидной природы методом MALDI-MS (обзор). Научное приборостроение. 2010, 4: 21-35.
7. Ильина Е. Н. Молекулярные средства измерения в современной микробиологической лаборатории. Клин. лаб. диагностика. 2013, 9: 70.
8. Краснов Н. В., Лютвинский Я. И., Подольская Е. П. Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации в протеомном анализе. Научное приборостроение, 2010, 4: 5-20.
9. Лебедев А. Т., Заикин В. Г. Задачи и достижения современной масс-спектрометрии. Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2007, 2: 21-29.
10. Полунина Т.А., Киреев М. Н., Храмченкова Т.А., Спицын А. Н., Григорьева Г. В. Масс-спектрометрия в медицине и биотехнологии. Журн. микробиол. 2013, 5: 112-118.
11. Супотницкий М. В. Бактериальные токсины. Их природа, механизмы действия, возможности конструирования гибридных и модифицированных токсинов. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2011, 1: 6-16.
12. Тарасова И. А. Жидкостная хроматография в критических условиях в сочетании с масс-спектрометрией для изучения первичной структуры биомолекул, Дисс. на соискание уч. степени кандидата физико-математических наук. 2007.
13. Юрин Ю. А., Хайруллин Р. З., Салафутдинов И. И. Масс-спектрометрическая идентификация стафилококковых пептидгидролаз. Вестник технологического университета. 2015, 16: 287-289.
14. Barr J. R., Mjura H., Boyer A. E. et al. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. Emerg. Infect. Dis. 2005, 10: 224-234.

15. Bilitewski U., Brenner-Weiss G., Hansen P.-D. et al. Bioresponse-linked instrumental analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2000, 7: 428-443.
16. Bhat V.R., Ramakrishna J., Sashidhar R.B. Outbreak of mycotoxicosis in Kashmir Valley. *Nutrition news India*. 1989, 1: 1-3.
17. Cheng K., Chui H., Domish L. D. et al. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics-Clinical Applications*. 2016, 4: 346-357.
18. Clark R.F., Williams S.R., Nordt S.P. et al. A review of selected seafood poisonings. *Undersea Hyperb Med*. 1999, 26: 175-184.
19. Clifton K. F., Zaragoz J. W. Bacteriophage cell lysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* for top-down proteomic identification of Shiga toxins 1 & 2 using matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2016, 6: 671-680.
20. Finlay B., Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev*. 1997, 2: 210-230.
21. Hillenkamp F., Karas M. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal. Chem*. 1991, 24: 1193A-1202A.
22. Hiroshi Hinou, Masaki Kuroguchi, Hiroki Shimizu et al. Characterization of *Vibrio cholerae* neuraminidase by a novel mechanism-based fluorescent labeling reagent. *Biochemistry*. 2005, 35: 11669-11675.
23. Hjærnø K., Højrup P. Interpretation of tandem mass spectrometry (MSMS) spectra for peptide analysis. *Methods in Molecular Biology*. 2015, 1348: 83-102.
24. Kalb S. R., Boyer A. E., Barr J. R. Mass spectrometric detection of bacterial protein toxins and their enzymatic activity. *Toxins*. 2015, 7: 3497-3511.
25. Karas M., Bachmann D., Bahr D., Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc*. 1987, 78: 53-68.
26. Karas M., Glikmann M., Schefer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J. Mass Spectrom*. 2000, 35: 1-12.
27. Kull S., Pauly D., Stormann B. et al. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem*. 2010, 82 (7): 2910-2924.
28. Nedelkov D., Nelson R.W. Detection of Staphylococcal enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol*. 2003, 9: 5212.
29. Nedelkov D., Rasooly A., Nelson R.W. Multitoxin biosensor-mass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food. *Int. J. Food Microbiol*. 2000, 1: 1-13.
30. Paauw A., Trip H., Niemcewicz M. et al. OmpU as a biomarker for rapid discrimination between toxigenic and epidemic *Vibrio cholerae* O1/O139 and non-epidemic *Vibrio cholerae* in a modified MALDI TOF MS assay. *BMC Microbiol*. 2014, 14 (1): 158.
31. Pappin D. J., Hojrup P. N., Bleasby A. J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol*. 1993, 6: 327-332.
32. Pupo E., Phillips N. J., Gibson B. W. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry of lipopolysaccharide species separated by slabpolyacrylamide gel electrophoresis: high-resolution separation and molecular weight determination of lipooligosaccharides from *Vibrio fischeri* strain HMK. *Electrophoresis*. 2004, 25 (14): 2156-2164.
33. Roy-Lachapelle A., Sollicec M., Bouchard MF. et al. Detection of cyanotoxins in algae dietary supplements. *Toxins (Basel)*. 2017, 9 (3): E76.
34. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem*. 1996, 5: 850-858
35. Switzer L., Giera M., Niessen W. Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *J. Proteome Res*. 2013, 12: 1067.
36. Tsilia V., Devreese B., de Baenst I. et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, 6: 1691-1702.
37. Thevis M., Loo R.R., Loo J.A. Mass spectrometric characterization of transferrins and their

fragments derived by reduction of disulfide bonds. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003, 6: 635-647.

38. Van Baar B.L.M., Hulst A.G., Wils E.R.J. Characterisation of cholera toxin by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Toxicon.* 1999, 1: 85-108.
39. Van Baar B.L.M., Hulst A.G., Roberts B. et al. Characterization of tetanus toxin, neat and in culture supernatant, by electrospray mass spectrometry. *Analytical Biochemistry.* 2002, 2: 278-289.

Поступила 05.07.17

Контактная информация: Чемисова Ольга Сергеевна, к.б.н.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863) 240-35-94

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.В.Шубникова, Л.К.Мерينو́ва, Т.В.Сени́на, Е.В.Коро́ль, О.А.Мерино́ва

БИОПЛЕНКИ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ И ИХ РОЛЬ В РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Обзор содержит данные литературы, касающиеся основных вопросов образования биопленок возбудителями мелиоидоза и сапа (*Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*). Рассмотрена роль известных структурных элементов клеток буркхольдерий (жгутиков, пилей IV типа, ЛПС), а также белков-автопереносчиков адгезинов в прикреплении бактерий к поверхностям, формировании микроколоний и образовании биопленки. Представлены материалы исследования генетических регуляторных механизмов (QS-систем, RpoE-сигма фактора, c-di-GMP, двухкомпонентной системы трансдукции сигналов TCS) и данные о дифференциально экспрессирующихся генах, имеющих отношение к формированию биопленки *B. pseudomallei*. Приведены результаты изучения роли биопленок в вирулентности и резистентности к антибиотикам патогенных буркхольдерий и их значения в развитии хронических форм и рецидивирующего течения мелиоидоза и сапа.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 101–111

Ключевые слова: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, биопленки, резистентность к антибиотикам

Е.В.Шубникова, Л.К.Мерино́ва, Т.В.Сени́на, Е.В.Коро́ль, О.А.Мерино́ва

BIOFILMS OF PATHOGENIC BURKHOLDERIA AND THEIR ROLE IN RESISTANCE TO ANTIBIOTICS

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

The review contains the current knowledge on the main issues of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* biofilm formation. The role of known structural elements of *Burkholderia* cells (flagella, type IV pili, LPS), as well as autotransporter adhesin proteins in the attachment of bacteria to surfaces, the formation of microcolonies and biofilm is described. The review also includes information of genetic regulatory mechanisms (QS-systems, RpoE-sigma factor, c-di-GMP, two-component signal transduction system), differentially expressed genes related to the formation of *B. pseudomallei* biofilm, role of biofilms in the virulence and resistance to antibiotics of pathogenic *Burkholderia* and their significance for the chronic processes and recurrent course of melioidosis and glanders.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 101–111

Key words: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, biofilms, resistance to antibiotics