



Идентификация микроорганизмов с применением газовой хромато-масс-спектрометрии

Писанов Р.В., Шипко Е.С., Дуванова О.В., Симакова Д.И.✉

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

В обзоре изложена основная информация, имеющаяся в литературе, об использовании метода газовой хромато-масс-спектрометрии. Обсуждены вопросы, затрагивающие значимость этого метода для идентификации микроорганизмов. Отмечена перспективность создания отечественного программного обеспечения и баз данных масс-спектров микроорганизмов.

Ключевые слова: идентификация микроорганизмов; жирные кислоты; хромато-масс-спектрометрия.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственной темы № 209-4-19 «Изучение спектров жирных кислот как биомаркеров штаммов *Vibrio cholerae*».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Писанов Р.В., Шипко Е.С., Дуванова О.В., Симакова Д.И. Идентификация микроорганизмов с применением газовой хромато-масс-спектрометрии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 356–362.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-8>

Поступила 17.10.2019

Принята в печать 28.05.2020

Identification of microorganisms using gas chromatomass-spectrometry

Ruslan V. Pisanov, Elena S. Shipko, Olga V. Duvanova, Diana I. Simakova✉

Rostov-on-Don Antiplague Research Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia

The review presents the basic information available in literature on the use of gas chromatography-mass-spectrometry. Issues concerning the significance of this method for the identification of microorganisms are discussed. The prospects of creating domestic software and databases of mass spectra of microorganisms are noted.

Keywords: identification of microorganisms; fatty acids; gas chromatomass-spectrometry.

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the state theme No. 209-4-19 «Study of the spectra of fatty acids as biomarkers of *Vibrio cholerae* strains».

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Pisanov R.V., Shipko E.S., Duvanova O.V., Simakova D.I. [Identification of microorganisms using gas chromatomass-spectrometry]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 356–362. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-8>

Received 17 October 2019

Accepted 28 May 2020

Существует множество методов идентификации микроорганизмов (МО): фенотипические, генотипические, хемотаксономические методы, прямое белковое профилирование и др. [1]. Каждый из этих методов имеет свои достоинства и недостатки и применяется в зависимости от цели эксперимента.

Одним из современных методов, используемых для дифференциации и идентификации МО, является метод газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС). Он основан на сочетании двух аналитических методов: капиллярной газовой хроматографии и масс-спектрометрии. Принцип метода —

качественное и количественное определение маркерных веществ МО (жирных кислот (ЖК), альдегидов, спиртов, стерина и др.) непосредственно в исследуемом материале.

Количественное газохроматографическое определение индивидуальных ЖК в биологических объектах является одним из наиболее востребованных методов аналитической и клинической биохимии: оно широко используется при оценке пищевой ценности продуктов питания, для таксономического и судебно-медицинского установления природы биологических образцов, в качестве источника информативных биомедицинских критериев в диагностике заболеваний разной этиологии, в научно-исследовательских, бактериологических и ветеринарных лабораториях [2]. Одной из перспектив применения газовой хроматографии в биомедицинских исследованиях является концепция метаболических профилей — систем интегральной оценки метаболизма как для макроорганизмов (метаболические профили биосред: мочи, крови, слюны, выдыхаемого воздуха), так и для МО. Метаболические профили так же индивидуальны, как и отпечатки пальцев [3].

Наличие специфических веществ (маркеров) в исследуемых образцах открывает возможность для направленного поиска и идентификации МО в сообществах с использованием метода ГХ/МС. Так, с определения маркера были начаты работы группы американских исследователей под руководством D.C. White [4], впоследствии изучивших структуру микробных сообществ [5] различных групп МО по известным маркерам без количественных определений видового состава сообщества. Установлено, что нечетные, разветвленные и циклопропановые ЖК, а также жирные альдегиды встречаются преимущественно у грамположительных бактерий, а высшие жирные β -оксикислоты присущи только грамотрицательным МО. К настоящему времени состав ЖК большинства МО III и IV групп патогенности изучен [6–13], показана его воспроизводимость, доказаны родо- и видоспецифичность ЖК [14].

Разработанный Г.А. Осиповым алгоритм [14] позволил не только рассчитать качественный и количественный состав микробного сообщества, в том числе МО III–IV групп патогенности, в биотопах человека, но и следить за изменением его состава, отслеживая изменения метаболизма МО методом ГХ/МС.

Идентификация МО путем получения профиля ЖК включает в себя несколько последовательных этапов:

- рост и накопление бактерий в определенных условиях;
- омыление клеточных липидов;
- метилирование ЖК;
- экстракцию и очистку метиловых эфиров ЖК;

- разделение метиловых эфиров ЖК газовой хроматографией;
- идентифицирование и количественное определение пиков.

Полученные профили можно сравнить с серией библиотек профилей и списком бактерий с наиболее похожими профилями, представленными вместе с расчетом относительного сходства. За рубежом продаются подобные системы, например система микробиологической идентификации «Sherlock» («MIDI Inc. Delaware», США), запущенная в 1991 г. для быстрой идентификации более 1500 видов МО путем анализа ЖК и альдегидов [15]. Программное обеспечение позволяет автоматизировать газовую хроматографию. Метод хорошо себя зарекомендовал; результаты, полученные путем ГХ/МС-анализа, были аналогичными данным, полученным с использованием молекулярно-биологических методов исследования.

Необходимо отметить, что значимость системы микробиологической идентификации зависит от вида исследуемого МО. Наибольшая сложность возникает при проведении внутривидовой межштаммовой дифференциации. Высокая степень варибельности ЖК-состава либо высокая гомология спектров ЖК изолятов одного вида не всегда позволяют провести внутривидовую дифференциацию [16, 17]. Поэтому в настоящее время для идентификации МО, помимо ЖК, в качестве биомаркеров используют сахара, аминокислоты, нуклеозиды, органические кислоты и некоторые вторичные метаболиты. Также следует учитывать тот факт, что на фенотипическую экспрессию ЖК в клеточных стенках бактерий или клеточных мембранах влияет целый ряд факторов, включая состав среды, температуру культивирования и фазу роста. В связи с этим требуется строгая стандартизация протокола исследования.

В России на основе ГХ/МС также была разработана и внедрена в практику комплексная автоматизированная хемотаксономическая система для обнаружения патогенных бактерий, возбудителей острых кишечных инфекций в продуктах питания по профилю ЖК [18]. Подобно работе с использованием системы микробиологической идентификации «Sherlock», не исключен этап выделения чистых культур с помощью селективных питательных сред. Авторами была создана отечественная база данных по ЖК для более чем 200 микробов, принадлежащих к 12 родам (*Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Listeria*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Francisella*). В настоящее время метод ГХ/МС с анализом спектра ЖК успешно используется для описания и характеристики патогенных бактерий III–IV групп [14].

В то же время сведений о применении данного подхода для идентификации возбудителей особо

опасных инфекционных заболеваний мало. В частности, в отношении возбудителя холеры в доступной литературе обнаружена работа американских авторов [19], в которой была предпринята попытка провести межвидовую дифференциацию представителей семейства *Vibrionaceae* по наличию или отсутствию гидроксид-, разветвленных, циклопропановых и ненасыщенных ЖК. В эксперимент были взяты 16 представителей семейства, которые в процессе анализа были разделены на 12 групп. Низкая специфичность метода могла быть обусловлена недостаточно полной на тот момент базой данных молекулярных маркеров МО. В настоящее время такая база данных включает информацию по ЖК, спиртам, стеролам и другим биологически активным соединениям МО (более 200 позиций), что является достаточно для определения таксономической принадлежности МО на уровне рода, а иногда и вида.

Т.Е. Кузьменко с соавт. [20] исследовали состав ЖК свободных липидов у 3 штаммов *Vibrio cholerae* O1: 1 штамма El Tor и 2 штаммов классического биовара. Следует отметить, что немногочисленные работы по попытке изучения состава ЖК у холерных вибрионов проводились на разном оборудовании с применением различных методических приемов выделения и идентификации без стандартизации условий культивирования МО, что не позволяло адекватно интерпретировать полученные результаты.

В 1996 г. группой исследователей была проведена идентификация двух клинических изолятов *F. tularensis* от пациентов с пневмонией. При сравнении спектров ЖК с применением базы данных MIDI была подтверждена их видовая принадлежность и обнаружены межштаммовые различия. В данном исследовании показано, что дискриминирующая способность метода ГХ/МС аналогична методу полногеномного секвенирования [21].

Т.Т. Inglis и соавт. [22] показали возможность дифференциации близкородственных штаммов — *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia thailandensis*. В результате проведенного исследования показано, что в состав клеток штамма *B. pseudomallei*, вызывающего мелиоидоз, входит 2-гидрокситетрадекановая кислота. Данная кислота отсутствует в составе клеток непатогенного штамма *B. thailandensis*.

Разрешающая способность метода ГХ/МС для дифференциации представителей рода *Yersinia* показана в работе A. Leclercq и соавт. [16]. Анализ соотношения ЖК (12:0/16:0 и 14:0/16:0) позволил разделить род *Yersinia* на 3 кластера: непатогенные иерсинии; патогенные изоляты *Yersinia enterocolitica*; *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis*. При анализе 29 штаммов *Y. pestis* были выявлены основные ЖК: 12:0, 14:0, 3-ОН-14:0, 16:0, 16:1ω9-цис, 17:0-цис и 18:1ω9-транс. Авторы отметили, что состав

ЖК штаммов *Y. pestis* был достаточно однороден и не зависел от биотипа, риботипа и эпидемиологических характеристик.

В 2000 г. группа исследователей применила метод ГХ/МС для сравнения ЖК-спектров спорных и вегетативных клеток аэробных бацилл, образующих эндоспору (роды *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Brevibacillus*). В ходе исследования была продемонстрирована высокая воспроизводимость метода ГХ/МС. Показано, что как в спорных, так и в вегетативных формах преобладают разветвленные насыщенные ЖК. При этом содержание насыщенных ЖК в спорных формах значительно выше, чем в вегетативных. По мнению авторов, анализ спектра ЖК может быть дополнительным инструментом при проведении хемотаксономического анализа аэробных бацилл [23]. Метод ГХ/МС был успешно использован для исследования неизвестных порошков на предмет наличия спор сибирской язвы [24].

Кроме исследования ЖК-состава мембран, метод ГХ/МС широко используется для характеристики липополисахарида (ЛПС). Установлено, что, имея общую структуру ЛПС, липид А у разных представителей грамотрицательных бактерий отличается по головным заместителям, количеству и составу ЖК. В зависимости от вида МО состав липида А может варьировать от 4 ЖК (*Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Pseudoalteromonas issachenkonii* КММ 3549Т), образуя тетраацилированные формы липида А, до 7 ЖК — гептаацилированные варианты липида А (*Erwinia carotovora* и *Acinetobacter radioresistens* S13). Большинство гексаацилированных молекул липида А имеют асимметричное распределение ЖК между глюкозаминами дисахарида липида А. Симметричное (2 + 2) распределение ЖК обнаружено в липиде А из *Coxiella burnetii* и некоторых гексаацилированных (3 + 3) структурах. В составе эндотоксинов из морских бактерий *Pseudoalteromonas haloplanktis* ТАС 125 и *Alteromonas addita* КММ 3600Т идентифицированы пентаацилированные структуры липида А [25–27].

N. Phillips с соавт. [28] провели исследование модификаций липида А ЛПС возбудителя туляремии. В работе были использованы 2 штамма: *F. tularensis* LVS (ATCC 29684) с ранее изученным жирнокислотным профилем липида А и *F. tularensis* 1547-57 (тип В). При использовании метода ГХ/МС показано, что штамм *F. tularensis* 1547-57 (тип В) имеет схожий с *F. tularensis* LVS ЖК-состав липида А, но дополнительно содержит в составе длинноцепочечные ЖК ($C_{20:0}$, $C_{22:0}$, $C_{24:0}$). В ходе дальнейшего исследования липида А было показано присутствие в нем галактозамина. По мнению авторов, данная модификация липида А может влиять на устойчивость бактерии к действию антимикробных пептидов. Применение метода ГХ/МС позволило выявить

молекулярные маркеры природного и вакцинного штаммов туляремийного микроба.

В диагностических целях используется мультиионный метод ГХ/МС-анализа *in situ*, созданный отечественными исследователями, который позволяет проводить идентификацию возбудителя непосредственно в биологическом материале (мокрота, гнойный экссудат, биоптаты тканей и др.), минуя стадию выделения чистой культуры. Данный метод предусматривает проведение идентификации по 150 микробным маркерам одновременно, что делает анализ на основе ГХ/МС экспрессным методом диагностики [29].

Метод ГХ/МС может быть использован для реконструкции видового состава и структуры экологических сообществ МО [3], позволяя определять состав микробного сообщества не только качественно, но и количественно [30], включая патогенные МО в биотопах человека, а также следить за изменением состава микробиоценоза и отслеживать изменения метаболизма его участников [14, 31, 32]. Показана возможность применения газохроматографического анализа для определения наличия в пробах клинического материала возбудителей анаэробных инфекций [3]. При таком инфекционном процессе в пробах гноя, дренажной жидкости открытой раны накапливаются летучие ЖК С3–С6 (в том числе изомерные), тогда как при инфекции аэробного происхождения — уксусная кислота и нелетучие кислоты [3].

Изучение профиля ЖК позволяет получать данные о микробном сообществе некультивируемых МО при бактериологическом анализе.

Методы ГХ/МС могут быть успешно использованы в изучении адаптационных свойств МО. Спектр ЖК является фенотипической характеристикой бактериальной клетки. Вариации его состава позволяют судить об изменениях условий культивирования МО. В настоящее время наиболее изучен регуляторный механизм адаптации бактерий к температурному режиму окружающей среды [33, 34].

Клеточные мембраны бактерий представляют собой сложные гетерогенные системы, физико-химические свойства которых зависят от количественного и качественного состава липидных компонентов. Наглядным примером могут служить изменения вязкости мембран, ассоциированных со спектром ЖК, у бактерий рода *Yersinia*. Установлено, что повышение вязкости мембраны при снижении температуры культивирования обусловлено изменением физических свойств мембранных липидов, связанным со способностью МО модулировать спектр ЖК, входящих в состав фосфолипидов [33].

F. Chen и соавт. [35] изучили пути метаболизма двух штаммов возбудителя туляремии: *F. tularensis* subsp. *holarctica* (патогенный для человека) и *F. tularensis* subsp. *novicida* (непатогенный для чело-

века). При изучении ГХ/МС-методом профиля изотопологов аминокислот, полисахаридного деривата глюкозы, фруктозы, аминсахаров, ЖК, 3-гидроксисубутирата, лактата, сукцината и малата показано, что штаммы в различной степени используют данные субстраты. По мнению авторов исследования, различия в использовании субстратов могут быть связаны с вирулентностью штаммов и их персистенцией в организме хозяина и переносчика.

Одним из ключевых моментов при проведении ГХ/МС является анализ полученных данных. Подход основан на анализе времени выхода вещества и наличия нескольких значимых ионов. Данный метод анализа является наиболее точным и дает наилучшие результаты, однако сильно зависит от используемого оборудования — одно и то же вещество будет иметь разное время удержания при применении разных колонок. Это делает практически невозможным использование данных, полученных другими авторами, и требует создания баз данных именно на «своем» оборудовании. Помимо этого практически все базы данных содержат масс-спектры отдельных веществ, а не целых МО. Одной из возможных проблем использования зарубежного программного обеспечения и баз данных является зависимость от хаотичной санкционной политики зарубежных стран, что может привести к блокированию работы дорогостоящего импортного оборудования. Все это делает актуальными работы по созданию отечественного программного обеспечения, баз данных масс-спектров веществ и базы профилей МО для их идентификации с помощью ГХ/МС.

Выводы

Таким образом, ГХ/МС-метод характеризуют:

- высокая чувствительность (1×10^3 – 1×10^4 клеток в пробе) и достоверность, возможность использования в клинической диагностике;
- способность выявлять возбудителей инфекций, находящихся в «спящем» состоянии (микробиоты окупаны защитной полисахаридной капсулой);
- универсальность методики в отношении разных групп МО: бактерий, грибов, вирусов;
- экспрессность — полное время анализа составляет 2 ч;
- селективность — возможность идентификации МО до вида;
- использование любого биоматериала.

Метод лишен недостатков классических методов идентификации и дифференциации. Так, в отличие от бактериологических исследований ГХ/МС — экспрессный метод: отсутствуют стадии повторных пересевов и биохимических тестов, которые особенно сложны, трудоемки и длительны. Нет необходимости в получении чистой культуры;

возможна идентификация некультивируемых форм МО. В отличие от иммуносерологических исследований ГХ/МС — прямой метод: отсутствуют ошибочные определения, связанные с индивидуальными вариациями иммунного ответа; он также более чувствительный. В отличие от молекулярно-биологических методов дается адекватная количественная оценка; метод менее дорогой, для его реализации используются доступные любым лабораториям химические реактивы и методики пробоподготовки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Старостин К.В., Демидов Е.А., Розанов А.С., Брянская А.В., Пельтек С.Е. Исследование воспроизводимости результатов идентификации микроорганизмов с помощью метода МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии в зависимости от условий культивирования на примере *Geobacillus stearothermophilus*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013; 17(4-1): 748-57.
2. Ариповский А.В., Колесник П.О., Кулагина Т.П., Титов В.Н. Подготовка проб для газохроматографического определения жирных кислот: преимущества безэкстракционного метода с прямой перэтерификацией липидов высушенных биологических проб. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(3): 141-7.
DOI: <http://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-141-147>
3. Хутаков Р.В., Саганов В.П., Раднаева Л.Д., Дамбаев Г.Ц., Хитрихеев В.Е., Доржиев Т.Э. Использование метода газовой хроматографии в диагностике и лечении больных острым холециститом (обзор литературы). *Вестник Бурятского государственного университета*. 2015; (12): 164-9.
4. Bobbie R.J., White D.C. Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980; 39(6): 1212-22.
5. Nichols P.D., Mancuso C.A., White D.C. Measurement of methanotroph and methanogen signature phospholipids for use in assessment of biomass and community structure in model system. *Org. Geochem.* 1987; 11(6): 451-61.
DOI: [http://doi.org/10.1016/0146-6380\(87\)90002-7](http://doi.org/10.1016/0146-6380(87)90002-7)
6. Попов Д.А., Овсиенко С.Т., Осипов Г.А., Вострикова Т.Ю. Ускоренный способ идентификации возбудителей бактериемий с применением метода газовой хромато-масс-спектрометрии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; (5): 54-8.
7. Birnbaum D., Herwaldt L., Low D.E., Noble M., Pfaller M., Sherertz R., et al. Efficacy of microbial identification system for epidemiologic typing of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(9): 2113-9.
8. Hoffmann M., Fischer M., Whittaker P. Evaluating the use of fatty acid profiles to identify deep-sea *Vibrio* isolates. *Food Chem.* 2010; 122(4): 943-50.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.015>
9. Huys G., Vancanneyt M., Coopman R., Janssen P., Falsen E., Altwegg M., et al. Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; 44(4): 651-8. DOI: <http://doi.org/10.1099/00207713-44-4-651>
10. Livesley M.A., Thompson I.P., Bailey M.J., Nuttall P.A. Comparison of the fatty acid profiles of *Borrelia*, *Serpulina* and *Leptospira* species. *J. Gen. Microbiol.* 1993; 139(4): 889-95.
DOI: <http://doi.org/10.1099/00221287-139-4-889>
11. Whittaker P., Fry F.S., Curtis S.K., Al-Khaldi S.F., Mossoba M.M., Yurawecz M.P., et al. Use of fatty acid profiles to identify food-borne bacterial pathogens and aerobic endospore-forming bacilli. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53(9): 3735-42.
DOI: <http://doi.org/10.1021/jf040458a>
12. Wu H.Y., Yan H., Zheng M.L., Sun M.M., Wang Q., Hu C.M., et al. *Legionella qingyii* sp. nov., isolated from water samples in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019; 69(7): 2017-22.
DOI: <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.003421>
13. Zayed M.E. Identification of two fungicide degrading *Pseudomonas* species by gas chromatography of cellular fatty acids. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 2004; 69(4): 779-88.
14. Верховцева Н.В., Осипов Г.А. Метод газовой хроматографии—масс-спектрометрии в изучении микробных сообществ почв агроценоза. *Проблемы агрохимии и экологии*. 2008; (1): 51-4.
15. Kunitsky C., Osterhout G., Sasser M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl esters (FAME) analysis and the MIDI Sherlock® Microbial Identification System. In: *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Volume 3*. Bethesda: Parenteral Drug Association; 2006: 1-18.
16. Leclercq A., Guiyoule A., El Lioui M., Carniel E., Decallonne J. High homogeneity of the *Yersinia pestis* fatty acid composition. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(4): 1545-51.
17. Whittaker P. Comparison of *Yersinia pestis* to other closely related *Yersinia* species using fatty acid profiles. *Food Chemistry*. 2009; 116(3): 629-32.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.073>
18. Комаров Г.Д., Помазанов В.В., Порсиус Н. Способ обнаружения и идентификации микроорганизмов. Заявка на изобретение № 97108375; 1997.
19. Lambert M.A., Hickman-Brenner F.W., Farmer Hi J.J., Moss C.W. Differentiation of Vibrionaceae species by their cellular fatty acid composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983; 33(4): 777-92.
DOI: <http://doi.org/10.1099/00207713-33-4-777>
20. Кузьменко Т.Е., Головная Р.В., Воронова Е.А. Исследование состава высших жирных кислот свободных липидов *Vibrio cholerae*. *Биоорганическая химия*. 1980; 6(1): 90-8.
21. Clarridge J.E. 3rd, Raich T.J., Sjusted A., Sandstrom G., Darouiche R.O., Shawar R.M., et al. Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(8): 1995-2000.
22. Inglis T.J.J., Aravena-Roman M., Ching S., Croft K., Wuthikannun V., Mee B.J. Cellular fatty acid profile distinguishes *Burkholderia pseudomallei* from avirulent *Burkholderia thailandensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(10): 4812-4.
DOI: <http://doi.org/10.1128/jcm.41.10.4812-4814.2003>
23. Song Y., Yang R., Guo Z., Zhang M., Wang X., Zhou F. Distinctness of spore and vegetative cellular fatty acid profiles of some aerobic endospore-forming bacilli. *J. Microbiol. Methods*. 2000; 39(3): 225-41. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00123-2](http://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00123-2)
24. Wills B., Leikin J., Rhee J., Saeedi B. Analysis of suspicious powders following the post 9/11 anthrax scare. *J. Med. Toxicol.* 2008; 4(2): 93-5. DOI: <http://doi.org/10.1007/bf03160961>
25. Кабанов Д.С., Прохоренко И.Р. Структурный анализ липополисахаридов грамотрицательных бактерий (обзор). *Биохимия*. 2010; 75(4): 469-91.
26. Корнеев К.В., Кондакова А.Н., Арбатский Н.П., Новотоцкая-Власова К.А., Ривкина Е.М., Анисимов А.П. и др. Различия в биологической активности липополисахаридов в зависимости от степени ацилирования липида А из мутантных штаммов *Yersinia pestis* и бактерий рода *Psychrobacter*. *Биохимия*. 2014; 79(12): 1629-35.
27. Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.S., Lee H., Lee J.O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009; 458: 1191-5.
DOI: <http://doi.org/10.1038/nature07830>
28. Phillips N.J., Schilling B., McLendon M.K., Apicella M.A., Gibson B.W. Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 2004; 72(9): 5340-8.
DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5340-5348.2004>
29. Осипов Г.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и их сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах. В кн.: *Химический анализ в медицинской диагностике*. М.: Наука; 2010: 293-368.
30. Шумилова Л.П., Куимова Н.Г. Изучение микробного сообщества городских почв методом газовой хроматографии—масс-спектрометрии. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2013; (50): 121-5.
31. Верховцева Н.В., Ларина Г.Е., Спиридонов Ю.Я., Степанов А.Л., Осипов Г.А. Микробные консорциумы почв агроценозов разных природных зон России с учетом их сельскохозяйственного использования. *Проблемы агрохимии и экологии*. 2008; (2): 37-43.
32. Полеско И.В., Осипов Г.А., Кабаева Т.И. Микроэкология организма человека при себорее и акне. *Детские инфекции*. 2006; 5(3): 26-33.

33. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Жирные кислоты как объект исследования температурных адаптационных стратегий микроорганизмов-психрофилов. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2015; (3): 43-9.
34. Сомова Л.М., Бузалева Л.С., Плехова Н.Г. *Ультроструктура патогенных бактерий в разных экологических условиях*. Владивосток: Медицина ДВ; 2009.
35. Chen F., Rydzewski K., Kutzner E., Häuslein I., Schunder E., Wang X., et al. Differential substrate usage and metabolic fluxes in *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; (7): 275. DOI: <http://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00275>

REFERENCES

1. Starostin K.V., Demidov E.A., Rozanov A.S., Bryanskaya A.V., Pel'tek S.E. Reproducibility of the results of microbe identification by MALDI-TOF mass spectrometry depending on growth conditions by the example of *Geobacillus stearothermophilus*. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2013; 17(4-1): 748-57. (in Russian)
2. Aripovskiy A.V., Kolesnik P.O., Kulagina T.P., Titov V.N. Preparation of samples for gas-chromatographic determination of fatty acids: direct transesterification of lipids of a dry biological sample is preferred in comparison with the methods employing preliminary lipid extraction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(3): 141-7. DOI: <http://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-141-147> (in Russian)
3. Khutakov R.V., Saganov V.P., Radnaeva L.D., Dambaev G.Ts., Khitrikheev V.E., Dorzhiev T.E. Use of gas chromatography method in the diagnosis and treatment of patients with acute cholecystitis (a review of references). *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2015; (12): 164-9. (in Russian)
4. Bobbie R.J., White D.C. Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980; 39(6): 1212-22.
5. Nichols P.D., Mancuso C.A., White D.C. Measurement of methanotroph and methanogen signature phospholipids for use in assessment of biomass and community structure in model system. *Org. Geochem.* 1987; 11(6): 451-61. DOI: [http://doi.org/10.1016/0146-6380\(87\)90002-7](http://doi.org/10.1016/0146-6380(87)90002-7)
6. Popov D.A., Ovsienko S.T., Osipov G.A., Vostrikova T.Yu. The express mode of identification of agents of bacteriemias using the technique of gas chromatography-mass spectrometry. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; (5): 54-8. (in Russian)
7. Birnbaum D., Herwaldt L., Low D.E., Noble M., Pfaller M., Sherrert R., et al. Efficacy of microbial identification system for epidemiologic typing of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(9): 2113-9.
8. Hoffmann M., Fischer M., Whittaker P. Evaluating the use of fatty acid profiles to identify deep-sea *Vibrio* isolates. *Food Chem.* 2010; 122(4): 943-50. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.015>
9. Huys G., Vancanneyt M., Coopman R., Janssen P., Falsen E., Altwegg M., et al. Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; 44(4): 651-8. DOI: <http://doi.org/10.1099/00207713-44-4-651>
10. Livesley M.A., Thompson I.P., Bailey M.J., Nuttall P.A. Comparison of the fatty acid profiles of *Borrelia*, *Serpulina* and *Leptospira* species. *J. Gen. Microbiol.* 1993; 139(4): 889-95. DOI: <http://doi.org/10.1099/00221287-139-4-889>
11. Whittaker P., Fry F.S., Curtis S.K., Al-Khaldi S.F., Mossoba M.M., Yurawecz M.P., et al. Use of fatty acid profiles to identify food-borne bacterial pathogens and aerobic endospore-forming bacilli. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53(9): 3735-42. DOI: <http://doi.org/10.1021/jf040458a>
12. Wu H.Y., Yan H., Zheng M.L., Sun M.M., Wang Q., Hu C.M., et al. *Legionella qingyii* sp. nov., isolated from water samples in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019; 69(7): 2017-22. DOI: <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.003421>
13. Zayed M.E. Identification of two fungicide degrading *Pseudomonas* species by gas chromatography of cellular fatty acids. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 2004; 69(4): 779-88.
14. Verkhovtseva N.V., Osipov G.A. Method of the gas-chromatography-mass-spectrometry in studying of the soil microbial communities. *Problemy agrokhimii i ekologii*. 2008; (1): 51-4. (in Russian)
15. Kunitzky C., Osterhout G., Sasser M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl esters (FAME) analysis and the MIDI Sherlock® Microbial Identification System. In: *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Volume 3*. Bethesda: Parenteral Drug Association; 2006: 1-18.
16. Leclercq A., Guiyoule A., El Lioui M., Carniel E., Decallonne J. High homogeneity of the *Yersinia pestis* fatty acid composition. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(4): 1545-51.
17. Whittaker P. Comparison of *Yersinia pestis* to other closely related *Yersinia* species using fatty acid profiles. *Food Chemistry*. 2009; 116(3): 629-32. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.073>
18. Komarov G.D., Pomazanov V.V., Porsius N. Method of detection and identification of microorganisms. Application for invention № 97108375; 1997. (in Russian)
19. Lambert M.A., Hickman-Brenner F.W., Farmer Hi J.J., Moss C.W. Differentiation of *Vibrionaceae* species by their cellular fatty acid composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983; 33(4): 777-92. DOI: <http://doi.org/10.1099/00207713-33-4-777>
20. Kuz'menko T.E., Golovnya R.V., Voronova E.A. A composition of higher fatty acids of *Vibrio cholerae* free lipids. *Bioorganicheskaya khimiya*. 1980; 6(1): 90-8. (in Russian)
21. Clarridge J.E. 3rd, Raich T.J., Sjosted A., Sandstrom G., Darouiche R.O., Shawar R.M., et al. Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(8): 1995-2000.
22. Inglis T.J.J., Aravena-Roman M., Ching S., Croft K., Wuthiekanun V., Mee B.J. Cellular fatty acid profile distinguishes *Burkholderia pseudomallei* from avirulent *Burkholderia thailandensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(10): 4812-4. DOI: <http://doi.org/10.1128/jcm.41.10.4812-4814.2003>
23. Song Y., Yang R., Guo Z., Zhang M., Wang X., Zhou F. Distinctness of spore and vegetative cellular fatty acid profiles of some aerobic endospore-forming bacilli. *J. Microbiol. Methods*. 2000; 39(3): 225-41. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00123-2](http://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00123-2)
24. Wills B., Leikin J., Rhee J., Saedi B. Analysis of suspicious powders following the post 9/11 anthrax scare. *J. Med. Toxicol.* 2008; 4(2): 93-5. DOI: <http://doi.org/10.1007/bf03160961>
25. Kabanov D.S., Prokhorenko I.R. Structural analysis of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria. *Biokhimiya*. 2010; 75(4): 469-91. (in Russian)
26. Korneev K.V., Kondakova A.N., Arbatskiy N.P., Novototskaya-Vlasova K.A., Rivkina E.M., Anisimov A.P., et al. Distinct biological activity of lipopolysaccharides with different lipid acylation status from mutant strains of *Yersinia pestis* and some members of genus *Psychrobacter*. *Biokhimiya*. 2014; 79(12): 1629-35. (in Russian)
27. Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.S., Lee H., Lee J.O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009; 458: 1191-5. DOI: <http://doi.org/10.1038/nature07830>
28. Phillips N.J., Schilling B., McLendon M.K., Apicella M.A., Gibson B.W. Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 2004; 72(9): 5340-8. DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5340-5348.2004>
29. Osipov G.A. Chromato-mass spectrometric analysis of microorganisms and their communities in clinical samples for infections and dysbiosis. In: *Chemical Analysis in Medical Diagnostics [Khimicheskii analiz v meditsinskoy diagnostike]*. Moscow: Nauka; 2010: 293-368. (in Russian)
30. Shumilova L.P., Kuimova N.G. The study of microbial association in city soils by the gas chromatography-mass spectrometry method. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*. 2013; (50): 121-5. (in Russian)
31. Verkhovtseva N.V., Larina G.E., Spiridonov Yu.Ya., Stepanov A.L., Osipov G.A. Microbic consortia of different natural zones agroecosis soils of Russia discounting their agricultural use. *Problemy agrokhimii i ekologii*. 2008; (2): 37-43. (in Russian)
32. Polesko I.V., Osipov G.A., Kabaeva T.I. Microecology of the human body in seborrhea and acne. *Detskie infektsii*. 2006; 5(3): 26-33. (in Russian)
33. Andryukov B.G., Somova L.M., Timchenko N.F. Fatty acid as an object of research of temperature adaptation strategies psychro-

- philes. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2015; (3): 43-9. (in Russian)
34. Somova L.M., Buzoleva L.S., Plekhova N.G. *Ultrastructure of Pathogenic Bacteria in Different Environmental Conditions [Ultrastruktura patogennykh bakteriy v raznykh ekologicheskikh usloviyakh]*. Vladivostok: Meditsina DV; 2009. (in Russian)
35. Chen F., Rydzewski K., Kutzner E., Häuslein I., Schunder E., Wang X., et al. Differential substrate usage and metabolic fluxes in *Francisella tularensis* subspecies holarctica and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; (7): 275. DOI: <http://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00275>

Информация об авторах:

Писанов Руслан Вячеславович — к.б.н., в.н.с., и.о. зав. лаб. диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>.

Шипко Елена Сергеевна — м.н.с. лаб. диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8517-2789>.

Дуванова Ольга Викторовна — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1702-1620>.

Симакова Диана Игоревна — к.б.н., н.с. лаб. диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5598-5271>.
E-mail: 740_280@mail.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Ruslan V. Pisanov — PhD (Biol.), main researcher, Deputy Head, Laboratory of diagnostics of especially dangerous infections, Rostov-on-Don Antiplague Research Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>.

Elena S. Shipko — junior researcher, Laboratory of diagnostics of especially dangerous infections, Rostov-on-Don Antiplague Research Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8517-2789>.

Olga V. Duvanova — PhD (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of especially dangerous infections, Rostov-on-Don Antiplague Research Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1702-1620>.

Diana I. Simakova — PhD (Biol.), researcher, Laboratory of diagnostics of especially dangerous infections, Rostov-on-Don Antiplague Research Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5598-5271>.
E-mail: 740_280@mail.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.