

не соответствовали требованиям ГОСТ Р 52253-2004, что обусловлено наличием в составе жиров немолочного происхождения;

- 4 пробы растительного масла не соответствовали требованиям ГОСТ 30623-98.

Полученные результаты подтверждают возможность применения усовершенствованной методики в химических лабораториях для рутинного анализа проб молока, молочной и растительной продукции при определении жирнокислотного состава с целью обнаружения фальсификации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ГОСТ 28928-91. Заменители масла какао. Метод определения состава триглицеридов. — М.: ИПК Изд-во стандартов, 2005. — 3 с.
- ГОСТ 30623-98. Масла растительные и маргариновая продукция. Метод обнаружения фальсификации. — М.: Стандартинформ, 2010. — 16 с.
- ГОСТ 31452-2012. Сметана. Технические условия. — М.: Стандартинформ, 2013. — 9 с.
- ГОСТ 31453-2013. Творог. Технические условия. — М.: Стандартинформ, 2013. — 10 с.
- ГОСТ 31663-2012. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров жирных кислот. — М.: Стандартинформ, 2013. — 8 с.
- ГОСТ 31754-2012. Масла растительные, жиры животные и продукты их переработки. Методы определения массовой доли трансизомеров жирных кислот. — М.: Стандартинформ, 2014. — 24 с.
- ГОСТ 31979-2012. Молоко и молочные продукты. Метод обнаружения растительных жиров в жировой фазе газожидкостной хроматографией стеринатов. — М.: Стандартинформ, 2014. — 10 с.
- ГОСТ Р 52253-2004. Масло и паста масляная из коровьего молока. Общие технические условия. — М.: ИПК Изд-во стандартов, 2004. — 21 с.
- ГОСТ Р ИСО 23275-1-2013. Жиры и масла животные и растительные. Эквиваленты масла какао в масле какао и шоколаде. Часть 1. Определение наличия эквивалентов масла какао. — М.: Стандартинформ, 2014. — 19 с.
- ГОСТ Р ИСО 23275-2-2013. Жиры и масла животные и растительные. Эквиваленты масла какао в масле какао и шоколаде. Часть 2. Определение количества эквивалентов масла какао. — М.: Стандартинформ, 2014. — 15 с.
- Журавлев А.В. Трансжиры: что это такое и с чем их едят (краткий вариант). — М., 2012. — 58 с.
- МУ 4.1./4.2.2484-09. Методические указания по оценке подлинности и выявлению фальсификации молочной продукции. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 26 с.
- Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 024/2011. Технический регламент на масложировую продукцию: утв. Решением Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011 г. № 883. — 37 с.
- Adlof R.O., Copes L.C., Emken E.A. Analysis of the Monoenoic Fatty Acid Distribution in Hydrogenated

Vegetable Oils by Silver-Ion High-Performance Liquid Chromatography // JAOCS. — 1995. — Vol. 72, № 5. — P. 571–574.

15. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / M. Holcapek, P. Jandera, P. Zderadicka, L. Hruby // J. Chromatogr. A. — 2003. — Vol. 1010. — P. 195–215.

16. Chemical profiling of triacylglycerols and diacylglycerols in cow milk fat by ultra-performance convergence chromatography combined with a quadrupole time-of-flight mass spectrometry / Q. Zhou, B. Gao, X. Zhang [et al.] // Food Chemistry. — 2014. — Vol. 143. — P. 199–204.

17. Determination of fatty acid profile in cow's milk using mid-infrared spectrometry: Interest of applying a variable selection by genetic algorithms before a PLS regression / M. Ferrand, B. Huquet, S. Barbey [et al.] // Chemom. Intell. Lab. Syst. — 2011. — Vol. 106, № 2. — P. 183–189.

18. Determination of free fatty acids in edible oils by ¹H NMR spectroscopy / C. Skiera, P. Steliopoulos, T. Kuballa [et al.] // J. Lipid Technology. — 2012. — Vol. 24, № 12. — P. 279–281.

19. Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography / L. Alonso, J. Fontecha, L. Lozada, M. Juarez // JAOCS. — 1997. — Vol. 74, № 2. — P. 131–135.

20. Determination of underivatized long chain fatty acids using RP-HPLC with capacitively coupled contactless conductivity detection / A. Makahleh, B. Saad, G. Siang [et al.] // J. Talanta. — 2010. — Vol. 81. — P. 20–24.

21. Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry / H. Soyeurt, P. Dardenne, F. Dehareng [et al.] // J. Dairy Sci. — 2006. — Vol. 89, № 9. — P. 3690–3695.

22. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids / L. Alonso, J. Fontecha, L. Lozada [et al.] // J. Dairy Sci. — 1999. — Vol. 82. — P. 878–884.

23. Juaneda P. Utilisation of reversed-phase high-performance liquid chromatography as an alternative to silver-ion chromatography for the separation of cis- and trans-C18:1 fatty acid isomers // J. Chromatogr. A. — 2002. — Vol. 954. — P. 285–289.

24. Occurrence of trans-C18:1 fatty acid isomers in goat milk: effect of two dietary regimens / M. LeDoux, A. Rouzeau, P. Bas, D. Sauvant // J. Dairy Sci. — 2002. — Vol. 85. — P. 190–197.

25. Precht D., Molken J. Identification and quantitation of cis/trans C16:1 and C17:1 fatty acid positional isomers in German human milk lipids by thin-layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry // European J. Lipid Sci. Technol. — 2000. — Vol. 102. — P. 102–113.

26. Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography / D.J. Fletouris, N.A. Botsoglou, I.E. Psomas, A.I. Mantis // J. Dairy Sci. — 1998. — Vol. 81. — P. 2833–2840.

УДК 619.579.842.14-02

ПРОТЕОМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИИ РОДА *SALMONELLA*

Н.Б. Шадрова¹, О.В. Прунтова², Г.С. Скитович³

¹ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shadrova@arriah.ru

² руководитель Испытательного центра, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: skitovich@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты изучения протеомических свойств изолятов бактерии рода *Salmonella* методом MALDI-TOF на масс-спектрометре MALDI Autoflex III. Идентификация микроорганизмов проводилась методом прямого нанесения с последующей процедурой сравнения полученных масс-спектров с установленной в приборе базой данных. Были определены пики, характерные для многих представителей семейства *Enterobacteriaceae*, и отношение масса/заряд (m/z), характеризующее представителей рода *Salmonella*.

Ключевые слова: масс-спектрометр, MALDI-TOF, бактерии рода сальмонелла.

ВВЕДЕНИЕ

Патогенные бактерии рода сальмонелла являются одними из основных возбудителей кишечных инфекционных болезней и представляют значительную проблему для здравоохранения в развитых и развивающихся странах, вызывая пищевые токсикоинфекции. Ежегодно в мире регистрируется 1,3 млрд случаев гастроэнтерита и 3 млн летальных случаев из-за заражения сальмонеллами.

Переносчиками сальмонелл являются преимущественно сельскохозяйственные животные, кроме того, передача сальмонелл может осуществляться от животного к человеку и от человека к человеку. Основным источником заражения человека сальмонеллами являются продукты как животного, так и растительного происхождения (мясо, яйца, молочные продукты, фрукты и овощи). Современное направление в производстве пищевых продуктов, называемое «органическое» растениеводство, также повышает риск пищевых отравлений, в том числе и сальмонеллеза [1].

В последнее десятилетие, наряду с классическими и молекулярно-биологическими методами идентификации микроорганизмов, все чаще применяется метод идентификации микроорганизмов по их белковым профилям, или прямое белковое профилирование. Данный метод не уступает по таким показателям, как точность и специфичность идентификации, однако его выгодно отличают быстрота проведения и более низкая себестоимость анализов [2, 3, 9, 10].

Метод времяпролетной MALDI масс-спектрометрии (MALDI-TOF) основан на десорбции и ионизации исследуемого вещества с помощью лазерного излучения

в присутствии матрицы с последующим разделением ионов во времяпролетном масс-анализаторе. Под воздействием лазерных импульсов матрица, сокристаллизованная с исследуемым веществом, активно поглощает излучение лазера, что приводит к ее десорбции. Переходя в газовую фазу, матрица увлекает за собой молекулы исследуемого вещества, а также способствует их ионизации с образованием преимущественно однозарядных ионов [7]. Метод позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции микробной клетки (прямое белковое профилирование), т. е. без фракционирования и очистки отдельных белков, и получать уникальные для данного вида масс-спектры с высокой точностью и разрешением, характеризующие исследуемый объект по типу «отпечатков пальцев» [4].

Для идентификации микроорганизмов обычно используют спектры в диапазоне масс 2–20 кДа. Анализ масс-спектров *E. coli* в данном диапазоне показал, что из 2000 белков, рассчитанных на основании данных секвенированного генома *E. coli*, в спектрах присутствует только 30 [11]. Большинство полученных пиков были отнесены к рибосомальным белкам, остальные — к ДНК-связывающим белкам и белкам холодового шока. Рибосомальные белки являются достаточно консервативными, что обеспечивает их таксономическую специфичность. Помимо этого, рибосомальные белки в большом количестве присутствуют в цитоплазме клеток — до половины массы растущей клетки, а их набор остается неизменным вне зависимости от внешних условий и стадии роста, что и обеспечивает воспроизводимость масс-спектров. Исследования внутри- и меж-

Таблица 1
Идентификация изолятов бактерий рода *Salmonella* методом белкового профилирования

№	Наименование изолята	Результат MALDI	Критерий идентификации, Ig*	Пик с интенсивностью 100 %, Da
1	<i>Salmonella</i> Typhimurium (говядина № 4975)	<i>Salmonella</i> sp. enterica	2,344	6092
2	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Башкирия»	<i>Salmonella</i> sp. choleraesuis	2,579	4363
3	<i>Salmonella</i> Typhimurium «пельмени № 1904»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,511	6092
4	<i>Salmonella</i> Brezany	<i>Salmonella</i> st anatum	2,559	6092
5	<i>Salmonella</i> California	<i>Salmonella</i> st anatum	2,574	6092
6	<i>Salmonella</i> Enteritidis «Py 3»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,488	6092
7	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Лен»	<i>Salmonella</i> sp. choleraesuis	2,574	4364
8	<i>Salmonella</i> Enteritidis «Глеб»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,423	6092
9	<i>Salmonella</i> Newland утка	<i>Salmonella</i> st anatum	2,591	6093
10	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Ил»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,445	4364
11	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Юб»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,442	6092
12	<i>Salmonella</i> Typhimurium «к/к 16»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,509	6092
13	<i>Salmonella</i> Typhimurium «к/к 7»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,509	6096
14	<i>Salmonella</i> Virchow свинина 31	<i>Salmonella</i> st anatum	2,506	6093
15	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Мордовия»	<i>Salmonella</i> sp. enterica st Hadar	2,348	4364
16	<i>Salmonella</i> Enteritidis мясо пельменное (курица) «Py 1»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,473	6091
17	<i>Salmonella</i> Enteritidis мясо пельменное «Pel»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,482	6092
18	<i>Salmonella</i> Moscow «Радон» комбикорм	<i>Salmonella</i> sp. enteritidis	2,477	6091
19	<i>Salmonella</i> Dublin «Рассвет»	<i>Salmonella</i> sp. enterica st dublin	2,536	6093
20	<i>Salmonella</i> Saintpaul	<i>Salmonella</i> st anatum	2,649	6092
21	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Краснодар»	<i>Salmonella</i> sp. enterica	2,247	4363
22	<i>Salmonella</i> S.W	<i>Salmonella</i> sp. enteritidis	2,408	6090
23	<i>Salmonella</i> Choleraesuis № 2 «Тамбов»	<i>Salmonella</i> sp. enterica	2,457	6092
24	<i>Salmonella</i> Choleraesuis свинина «Татарстан»	<i>Salmonella</i> sp. choleraesuis	2,528	6092
25	<i>Salmonella</i> Dublin «Кольчугино»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,654	6092
26	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Ульяновск»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,419	6092
27	<i>Salmonella</i> Choleraesuis «Владимир»	<i>Salmonella</i> st anatum	2,523	4364

* 2,300–3,000 — высокая вероятность идентификации вида;
2,000–2,299 — гарантированная идентификация рода, возможная идентификация вида;
1,700–1,999 — возможная идентификация рода.

лабораторной воспроизводимости показали высокую надежность метода MALDI-TOF [2].

Целью данной работы было изучение протеомических свойств изолятов бактерий рода сальмонелла, выделенных из пищевых продуктов и кормов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изоляты. 27 изолятов бактерий рода *Salmonella*, выделенных из пищевых продуктов и кормов на территории РФ в лаборатории микробиологии ФГБУ «ВНИИЗЖ» за 2006–2010 гг.

Матрица. Насыщенный раствор СНСА (α-циано-4-гидроксикоричная кислота) и органический растворитель (basic organic solvent) — раствор 50%-ный ацетонитрил/2,5% трифторуксусная кислота.

База данных для идентификации бактерий Bruker содержит спектры 4111 микроорганизмов, в том числе спектры 15 штаммов *Salmonella*.

Культивирование. Все используемые изоляты выращивали на колумбийском агаре (*Columbia agar base*) в течение 24 ч при 37°C.

Пробоподготовка. Применяли метод прямого нанесения, при котором единичные колонии свежей культуры наносили на лунки металлического планшета типа «Ground steel» Bruker, используя стерильную петлю. Покрывали сверху раствором матрицы. Высушивали в течение 15 минут. Помещали планшет в прибор.

Калибровку масс-спектрометра проводили перед каждым экспериментом согласно руководству [6], используя в качестве калибранта *Bruker Bacterial Standard* («Bruker» Daltonik, Германия).

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре MALDI Autoflex III Biotyper («Bruker» Daltonik, Германия), используя линейный режим. Параметры анализа оптимизировали для диапазона масс от 2000 до 20137 m/z (масса/время), записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 одиночных спектров. При идентификации сальмонелл использовали метод определения микроорганизмов в программном обеспечении: «MBT_MC». Для записи, обработки и анализа полученных масс-спектров использовали программное обеспечение flexControl, MALDI Biotyper версия 3.0 и MALDI Biotyper RTC («Bruker» Daltonik, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения протеомических свойств были отобраны бактерии из музея штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ», которые по биохимическим свойствам были идентифицированы как бактерии рода *Salmonella* и серотипированы по схеме Кауфмана–Уайта (табл. 1).

В связи с тем, что установленная в приборе база данных микроорганизмов включает только 13 серотипов сальмонелл, а существующее в настоящее время число серотипов сальмонелл по схеме Кауфмана и Уайта насчитывает более 2600, результаты идентификации MALDI в части определения серотипа могут не совпадать с результатами классического серотипирования.

В ходе работы по идентификации бактерий с использованием метода белкового профилирования [5, 7] было подтверждено, что все исследуемые микроорганизмы относятся к бактериям рода сальмонелла (табл. 1). При этом критерий идентификации микроорганизмов находился в диапазоне 2,236–2,649, что указывает на высокую вероятность идентификации.

В процессе идентификации бактерий методом MALDI-TOF для всех сальмонелл были построены белковые профили (рисунок), по которым стало возможным определение характерных пиков с высокой интенсивностью.

Было установлено, что 6 из 27 изученных изолятов сальмонелл имели в белковом спектре характерный пик с интенсивностью 100% и показателем m/z 4364 Da. Для всех остальных изолятов таким идентификационным пиком являлся 6092 Da.

По данным Zhou N. и Wang N. [12], уникальным пиком, характеризующим *Salmonella paratyphi*, является пик с величиной m/z 6092 Da. В нашем исследовании такой пик обнаруживался у всех изолятов сальмонелл наряду с пиком 4363 Da.

Был проведен анализ масс-спектров представителей сем. *Enterobacteriaceae*, представленных в базе данных Maldi Biotyper (табл. 2), и обнаружено, что пик 4363±1 Da характерен для многих представителей семейства *Enterobacteriaceae*, в то время как пик m/z 6092±1 Da встречается только у бактерий рода *Salmonella* и *Trabulsiella guamensis*. Бактерии *Trabulsiella* были открыты в 1985 г. и изначально были отнесены к роду *Salmonella* из-за схожести биохимических признаков [8].

Таким образом, пик m/z 6092 Da можно считать уникальным для бактерий рода *Salmonella*, и данная информация может быть использована при разработке экспресс-методов определения микроорганизмов непосредственно из суспензии материала, без предварительного выделения чистой культуры.

Кроме пиков, используемых для характеристики семейства и рода микроорганизма, по данным Dieckmann R. и Malorny B. [5], установлены характерные серотип-определяющие пики для 5 важнейших в эпидемиологическом значении серотипов сальмонелл: Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Infantis, Hadar. Кроме того, были определены потенциальные серовар-определяющие ионы, которые возможно использовать как биомаркеры для серотипов Choleraesuis, Heidelberg, Gallinarum (табл. 3). Полученные нами результаты подтверждают выводы Dieckmann R. и Malorny B. [5] в отношении серотипов Choleraesuis (*Salmonella* Choleraesuis «Башкирия», *Salmonella* Choleraesuis «Ил», *Salmonella* Choleraesuis «Лен», *Salmonella* Choleraesuis «Мордовия», *Salmonella* Choleraesuis «Владимир») и Enteritidis

(*Salmonella* Enteritidis «Py 3», *Salmonella* Enteritidis «Глеб», *Salmonella* Enteritidis «Pel») (табл. 3).

Отмечено, что изолят *Salmonella* Dublin «Рассвет» имел пик со значением m/z 6008 Da, характерный для серотипа Virchow, а из четырех изученных изолятов, определенных в реакции агглютинации как Typhimurium, характерный пик со значением m/z 7097 Da имел только один изолят — *Salmonella* Typhimurium «к/к № 16».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что для всех изученных изолятов сальмонелл характерными пиками являются m/z 4364 Da (характерный для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*) и 6092 Da (уникальный для бактерий рода *Salmonella*). Результаты, полученные при изучении протеомических характеристик различных серотипов сальмонелл, подтверждают выводы R. Dieckmann и B. Malorny в отношении показательных пиков для серотипов Choleraesuis и Enteritidis, но не в отношении изолятов *Salmonella* Typhimurium.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бхуниа А.К. Патогенные микроорганизмы пищевых продуктов. — Санкт-Петербург: «Профессия», 2014. — 344 с.
- Применение время пролетной Maldi масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов / Е.А. Демидов, К.В. Старостин, В.М. Попик, С.Е. Пельтек // Вавиловский журнал селекции и генетики. — 2013. — Т. 17, № 4/1. — С. 758–764.
- Anhalt J.P., Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry // Analytical Chemistry. — 1975. — Vol. 47. — P. 219–225.

Рис. Белковые профили изолятов бактерии рода *Salmonella*

По шкале абсцисс отложены значения m/z, по шкале ординат — относительная интенсивность пиков, регистрируемая при масс-спектрометрическом анализе.

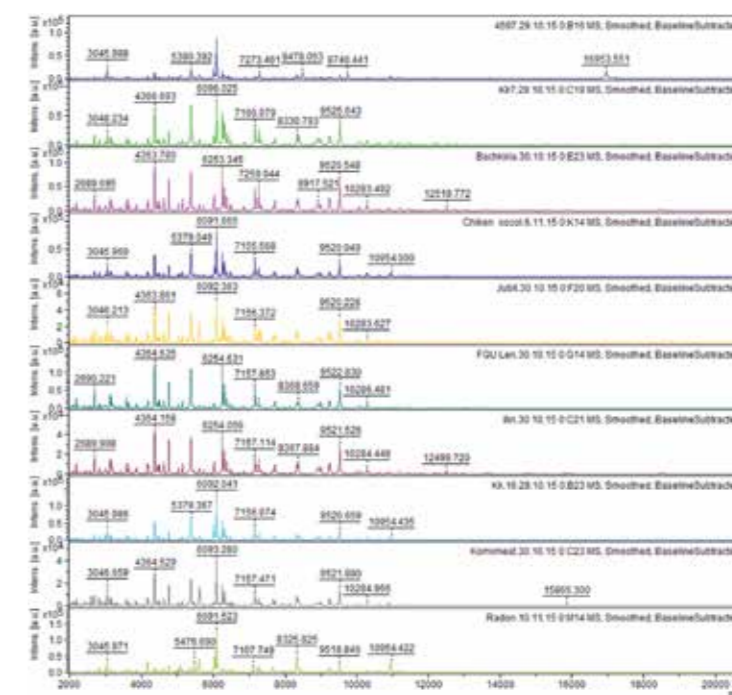


Таблица 2
Наличие характерных пиков у разных представителей сем. *Enterobacteriaceae*

Представители семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	Пики <i>Enterobacteriaceae</i>		Представители семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	Пики <i>Enterobacteriaceae</i>	
	4363±1 Da	6092±1 Da		4363±1 Da	6092±1 Da
<i>Arsenophonus</i>	-	-	<i>Morganella</i>	н/б	-
<i>Biostraticola</i>	н/б*	-	<i>Obesumbacterium</i>	н/б	-
<i>Brenneria</i>	-	-	<i>Pantoea</i>	-	-
<i>Buchnera</i>	н/б	-	<i>Pectobacterium</i>	-	-
<i>Budvicia</i>	-	-	<i>Phaseolibacter</i>	н/б	-
<i>Buttiauxella</i>	-	-	<i>Photorhabdus</i>	-	-
<i>Cedecea</i>	-	-	<i>Plesiomonas</i>	-	-
<i>Citrobacter</i>	-	-	<i>Pragia</i>	-	-
<i>Cosenzaea</i>	н/б	-	<i>Proteus</i>	-	-
<i>Cronobacter</i>	-	-	<i>Providencia</i>	-	-
<i>Dickeya</i>	4363	-	<i>Rahnella</i>	-	-
<i>Edwardsiella</i>	-	-	<i>Raoultella</i>	4364	-
<i>Enterobacter</i>	4364	-	<i>Saccharobacter</i>	н/б	-
<i>Erwinia</i>	4362	-	<i>Salmonella</i>	4363	6092
<i>Escherichia</i>	4364	-	<i>Samsonia</i>	-	-
<i>Ewingella</i>	4364	-	<i>Serratia</i>	-	-
<i>Gibbsiella</i>	н/б	-	<i>Shigella</i>	н/б	-
<i>Hafnia</i>	-	-	<i>Shimwellia</i>	4364	-
<i>Klebsiella</i>	4363	-	<i>Sodalis</i>	-	-
<i>Kluuyvera</i>	-	-	<i>Tatumella</i>	-	-
<i>Leclercia</i>	-	-	<i>Thorsellia</i>	н/б	-
<i>Leminorella</i>	-	-	<i>Trabulsiella</i>	4363	6093
<i>Lonsdalea</i>	н/б	-	<i>Wigglesworthia</i>	н/б	-
<i>Mangrovibacter</i>	н/б	-	<i>Xenorhabdus</i>	4364	-
<i>Moellerella</i>	-	-	<i>Yersinia</i>	-	-
			<i>Yokenella</i>	4364	-

н/б — нет базы данных.

4. Ben L.M., van Baar Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry // FEMS Microbiol. Rev. — 2000. — Vol. 24, № 2. — P. 193–219.
5. Dieckmann R., Malorny B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars using Whole-Cell MALDI-TOF mass spectrometry // Appl. Environ. Microbiol. — 2011. — Vol. 77, № 12. — P. 4136–4146.

6. MALDI Biotyper User Manual 2008, Version 2.0. SR1; Bruker Daltonic Inc.: Bremen, Germany, 2008. — 130 p.
7. Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of non-volatile compounds / M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillencamp // Int. J. Mass Spectrom. Ion Process. — 1987. — Vol. 78. — P. 53–68.
8. McWhorter A., Haddock R, Nocon F. *Trabulsiella guamensis*, a new genus new species of the family *Enterobacteriaceae* that resembles *Salmonella* subgroups 4 and 5 / J. Clin. Microbiol. — 1991. — Vol. 29. — P. 1480–1485.
9. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry / K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 1988. — Vol. 2, № 8. — P. 151–153.
10. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / S.B. Barbuddhe, T. Maier, G. Schwarz [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2008. — Vol. 74, № 17. — P. 5402–5407.
11. Ryzhov V., Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells // Analyt. Chem. — 2001. — Vol. 73, № 4. — P. 746–750.
12. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of bacteria cultured in liquid media / N. Zhou, N. Wang, B. Xu [et al.] // Science China Life Sciences. — 2011. — Vol. 54, № 1. — P. 48–53.

Таблица 3
Протеомическая характеристика отдельных серотипов сальмонелл

Масса (m/z)	Характеристика серотипов (по данным R. Dieckmann и B. Malorny)	Идентификация излятов <i>Salmonella</i> посредством MALDI Autoflex III Biotyper
6,008	<i>Virchow</i>	<i>Salmonella</i> Virchow свинина № 31 <i>Salmonella</i> Dublin «Рассвет»
6,022	<i>Choleraesuis</i>	<i>Salmonella</i> Choleraesuis свинина «Башкирия» <i>Salmonella</i> Choleraesuis «Ил» <i>Salmonella</i> Choleraesuis «Лен» <i>Salmonella</i> Choleraesuis «Мордовия» <i>Salmonella</i> Choleraesuis «Владимир»
6,036	<i>Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis «Пу 3» цыпленок <i>Salmonella</i> Enteritidis «Глеб» цыплята <i>Salmonella</i> Enteritidis мясо пельменное «Рел»
7,097	<i>Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium «комбикорм № 16»

UDC 619.579.842.14-02

PROTEOMIC PROPERTIES OF SALMONELLA ISOLATES

N.B. Shadrova¹, O.V. Pruntova², G.S. Skitovich³

¹ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shadrova@arriah.ru

² Head of the Testing Centre, Doctor of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: skitovich@arriah.ru

SUMMARY

The paper presents results of *Salmonella* of studying *Salmonella* isolate properties by MALDI-TOF method using MALDI Autoflex III mass-spectrometer. Microorganism identification was performed using direct loading method followed by comparison of mass spectra with the database set in the apparatus. Peaks typical of many *Enterobacteriaceae* representatives and mass to charge ratio (m/z), characterizing *Salmonella* were determined.

Key words: mass-spectrometer, MALDI-TOF, *Salmonella* bacteria.

INTRODUCTION

Salmonella pathogenic bacteria are one of the major agents of enteric infections and present great problems for public health in developed and developing countries as they cause food toxicoinfections. 1.3 billion gastroenteritis cases and 3 million deaths caused by *Salmonella* infection are registered annually.

Salmonella are transmitted mostly by livestock animals. Besides, *Salmonella* can be transmitted from animals to humans and from humans to humans. The main source of human *Salmonella* infection is animal and plant products (meat, eggs, dairy products, fruit and vegetables). The modern area of foodstuff production, the so called “organic” farming, also increases risk of food poisoning including salmonellosis [1].

Within the last decade microbial identification of protein profiles or direct protein profiling has been used more frequently together with classical, and molecular and biological methods of microbial identification. This method is competitive in such criteria as identification accuracy and specificity but it is more rapid and cost effective [2, 3, 9, 10].

Time-of-flight mass spectrometry MALDI (MALDI-TOF) is based on matrix assisted laser desorption and ionization of the tested substance followed by ion separation using time-of-flight mass-analyzer. When exposed to laser the matrix crystallized with the tested material actively absorbs laser irradiation which leads to its desorption. When transiting to gas-phase the matrix carries molecules of the tested substance and facilitates their ionization with formation of singly charged ions [7]. The method enables to perform direct mass-spectrometry of microbial cellu-

lar protein fraction (direct protein profiling), i.e. without fractionation and protein purification, and obtain highly accurate and high resolution mass-spectra, unique for this species, characterizing the tested object on the “fingerprint pattern” principle [4].

Spectra comprising a mass-range of 2–20 kDa are usually used for microbial identification. Analysis of mass-spectra of *E. coli* in this range demonstrated only 30 out of 2000 proteins, calculated basing on *E. coli* sequencing data, in spectra [11]. Most of the obtained peaks were referred to ribosomal proteins, and the rest to DNA-binding proteins and cold shock proteins. Ribosomal proteins are quite conservative and that makes them taxonomically specific. Besides, many ribosomal proteins are located in cell cytoplasm – up to the half mass of a growing cell, and their set remains unchanged not depending on external conditions and growth stage which ensures mass-spectrum reproducibility. Studies of intra- and inter-laboratory reproducibility demonstrated high reliability of MALDI-TOF method [2].

The study was aimed at proteomic properties of *Salmonella* isolates recovered from food products and feeds.

MATERIALS AND METHODS

Isolates. 27 *Salmonella* isolates recovered from food-stuffs and feeds in the Russian Federation by the FGBI «ARRIAH» microbiology laboratory in 2006–2010.

Matrix. Saturated CHCA solution (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid) and organic solvent (basic organic solvent) –50% acetonitrile solution/2,5% trifluoroacetic acid.