

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ MALDI-TOF MS В МЕДИЦИНЕ

© Рындина Е.С

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2

Резюме. Своевременность и точность диагностики инфекционных заболеваний связаны со снижением смертности и сокращением продолжительности госпитализации, особенно при тяжелых, угрожающих жизни инфекциях. В эру антибиотикорезистентности необходима быстрая диагностика, которая позволит на раннем этапе упорядочить эмпирические методы антимикробной терапии, тем самым способствуя ограничению появления и распространения устойчивости к противомикробным препаратам. Внедрение новой технологии на основе матрично-активизированного лазерного десорбционно/ионизационного времяпролетного анализатора (MALDI-ToF) масс-спектрометрии (MS) для рутинной идентификации микробных патогенов оказало глубокое влияние на микробиологическую диагностику и постепенно заменяет методы биохимической идентификации. Применение метода MALDI-ToF MS, помимо ускорения идентификации микроорганизмов, открывает новые перспективы по определению их чувствительности к антибиотикам и противомикотическим средствам.

Ключевые слова. Масс-спектрометрия, метод MALDI-ToF, идентификация бактерий.

PROSPECTS OF USING MALDI-TOF MS IN MEDICINE

© E. Ryndina

St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia

Abstract. The timeliness and accuracy of the diagnosis of infectious diseases are associated with a decrease in mortality and a reduction in the duration of hospitalization, specially in severe, life-threatening infections. In an era of antibiotic resistance, need quick diagnosis which will make it possible at an early stage to streamline empirical antimicrobial therapy, it helps to limit the appearance and spread of stability of antimicrobial resistance. The introduction of a new technology based on matrix-activated laser desorption / ionization — time-of-flight analyzer (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for routine identification of microbial pathogens has had a profound impact on microbiological diagnosis and gradually replaces the methods of biochemical identification. The application of the MALDI-ToF MS in addition to accelerating the identification of microorganisms, opens up new prospects for determining their sensitivity to antibiotics and antimicrotics.

Keyword. Mass spectrometry, MALDI-TOF method, identification of bacteria.

ВВЕДЕНИЕ

Ежегодно инфекционные заболевания уносят сотни тысяч жизней, а многие переболевшие получают неизлечимые осложнения на всю оставшуюся жизнь. Своевременность и точность диагностики инфекционных заболеваний связаны со снижением смертности и сокращением продолжительности госпитализации, особенно при тяжелых, угрожающих жизни инфекциях. Современный уровень развития медицины диктует новые требования к диагностике микробных инфекций. Часто применяемые на сегодняшнее время технологии, основанные на принципе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и физико-химическом анализе (хроматография, газовая хромато-масс-спектрометрия), позволяющие определять специфические молекулярные маркеры микроорганизмов [1–5] хорошо себя зарекомендовали в диагностике инфекционных

заболеваний, однако они имеют ряд ограниченный и недостатков: отсутствие полного перечня исследуемых патогенов, риск контаминации образцов во время пробоподготовки, не исключающей получение ложноположительных результатов, а также они не показывают культуральные свойства микроорганизмов. В эру антибиотикорезистентности необходима быстрая диагностика, которая позволит на раннем этапе упорядочить эмпирические методы антимикробной терапии, тем самым способствуя ограничению появления и распространения устойчивости к противомикробным препаратам [6]. Внедрение новой технологии на основе матрично-активизированного лазерного десорбционно/ионизационного времяпролетного анализатора (MALDI-ToF) масс-спектрометрии (MS) для рутинной идентификации микробных патогенов оказало глубокое влияние на микробиоло-

гическую диагностику и постепенно заменяет методы биохимической идентификации [7]. Преимущество метода MALDI-ToF MS заключается в идентификации бактерий и дрожжей непосредственно из колоний, выращенных на пластинах плотной питательной среды для первичной изоляции в течение нескольких минут, что значительно снижает материальные и трудовые затраты [8–12]. Проводятся исследования новых перспектив для MALDI-TOF MS, такие как идентификация патогенов непосредственно из положительных культур крови, подвидовая типизация и обнаружение детерминант лекарственной устойчивости.

Разработка новой технологии матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS) внесла существенное изменение в рабочий процесс микробиологических лабораторий [13–14].

В основу данного метода положена масс-спектрометрия, которая является аналитическим методом измерения массы молекул или атомов анализируемого вещества по их поведению в электрических и/или магнитных полях (молекулярные весы). На сегодняшний день масс-спектрометрия является важным инструментом для анализа сложных органических молекул, в том числе и полимеров [15–16]. Данный метод анализа долгое время было невозможно применять для исследования высокомолекулярных соединений природного и синтетического происхождения из-за их большой массы и низкой летучести, а также склонности к фрагментации при использовании наиболее распространенного метода ионизации — электронного удара.

Разработка метода MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization — MALDI) открыла возможность изменить суть процесса: перевод вещества из конденсированного состояния в газовую фазу под воздействием лазерного излучения, что позволяет «поднять» высокомолекулярные соединения, а также провести их «мягкую» ионизацию. Мягкая ионизация позволяет анализировать высокомолекулярные продукты без фрагментации и напрямую определять точные значения молекулярной массы биополимеров и проводить их идентификацию [17–18]. Наиболее часто данный метод используют с времяпролетным масс-анализатором (TOF — time of flight), что позволяет успешно определять основные классы биополимеров: пептидов, белков, нуклеиновых кислот, липидов и полисахаридов.

Применение масс-спектрометрии (МС) для идентификации бактерий было впервые пред-

ложено Анхальтом и Фензелуа в 1975 г. [19]; оно основывалось на наблюдении различных масс-спектров, полученных из бактериальных экстрактов разных видов. Однако жесткая ионизация позволила обнаружить только бактериальные липиды, что ограничило возможность различения бактерий на видовом уровне. Анализ биомолекул с высокой молекулярной массой, таких как полипептиды, стал возможным только во второй половине 1980-х годов. Независимый вклад в развитие данного метода внесли немецкие исследователи Франц Хилленкамп и Майкл Караш, а также японский инженер Коити Танака [20–21]. В 1984 году Хилленкамп и Караш впервые с помощью метода MALDI провели анализ мелитина — нелетучего пептида, основного компонента пчелиного яда, о чем было опубликовано в журнале *Analytical Chemistry*. Разработанный метод мягкой ионизации ученым Коити Танака позволил проводить анализ биомолекул с высокой молекулярной массой. О значимости данного метода свидетельствует и тот факт, что в 2002 году Коити Танака был удостоен Нобелевской премии по химии за разработку метода для анализа природных макромолекул. За последние десятилетия вся суть исследований сводилась к усовершенствованию программного обеспечения и базы данных, а так же улучшению MALDI-ToF MS, как более надежного и точного инструмента для идентификации микроорганизмов.

Метод MALDI-ToF MS основан на мягкой ионизации смеси микроколичеств исследуемого материала с матриксом под воздействием импульсного лазерного излучения. В свою очередь матрикс представляет собой вещество, обладающее сильными поглощающими свойствами оптической энергии в диапазоне излучаемой лазером длины волны [22–23]. Поглощение матриксом энергии лазера приводит к десорбции анализируемых веществ с их ионизацией и переходом в газовую фазу [24–25]. Под воздействием электрического поля, образовавшиеся однозарядные ионы движутся в вакуумной трубе от источника ионизации (катода) к аноду-детектору. При этом ионы с малой массой «летят» быстрее, чем большей массой. Таким образом, время пролета, необходимое для достижения ионами детектора, зависит от отношения массы к заряду (m/z), которое в случае однозарядных ионов ($z=1$) равно их массе. На выходе детектора получается масс-спектр исследуемого вещества, состоящий из пиков различной интенсивности, находящихся в диапазоне масс от 2 до 20 кДа [26]. Полученные данные определяют значение оценки от 0 до 3 и рассчиты-

ваются программным обеспечением на основе пиковых сходств между наблюдаемым спектром и сохраненными опорными спектрами; значения баллов $>2,00$ указывают на высокий доверительный вид ID, значения баллов $>1,70$ и $<2,00$ указываются как низкий доверительный ID, а оценки $<1,7$ считаются ненадежными (без ID) [27–28]. При этом указывается условное значение Score, характеризующее качество и точность анализа [29]. Стандартная пробоподготовка образца для исследования методом MALDI-ToF MS занимает не более 5–7 минут. Bruker Biotyper (Bruker Daltonics) и Vitek MS (bioMérieux) являются двумя наиболее широко используемыми системами MALDI-ToF MS для бактериальной идентификации в диагностических микробиологических лабораториях [30–31].

Традиционные микробиологические методы бактериальной идентификации включают в себя культуру, микроскопическое исследование и биохимическое тестирование. Эти процедуры могут быть точными и надежными, по крайней мере, для большинства классических микробных патогенов, но они также отнимают много времени, трудоемки и требуют специально обученного персонала для правильной интерпретации результатов.

При оценке работы базы данных MALDI-ToF MS показали хорошие результаты [32–37]. В первой оценке точности система Biotyper правильно определила 95,4% от 1660 чистых бактериальных культур испытания, 84,1% на уровне видов и 11,3% на уровне рода [38]. Отсутствие идентификации и распознавания было в основном из-за недостаточной записи в базе данных для некоторых видов бактерий, но эти ограничения могут быть преодолены путем пополнения спектров базы данных [39–40]. В общем, чем выше качество исходной базы данных, являющейся основополагающей предпосылкой для правильной идентификации культур бактерий, тем достовернее будут полученные результаты.

Совершенствование базы данных записей с несколькими спектрами хорошо изученного вида дают высокие ставки для идентификации, к хорошо изученным видам относятся *Clostridium* spp. и *Helicobacter pylori*. Однако для микроорганизмов со сложной клеточной стенкой, таких как *Mycobacterium* spp. [41–43], точность идентификации часто не оптимальна, и конкретная предварительная обработка может потребовать извлечение белка до проведения MALDI-ToF MS [44–45]. Кроме того, определение некоторых видов бактерий также может быть проблематично, особенно это касается грамположительных бактерий,

таких как *Streptococcus pneumoniae* схожих с клеточной мембраной группы *Streptococcus oralis/mitis* и *Listeria* spp., но и некоторых грамотрицательных бактерий, таких как *Shigella* spp., имеющих низкий уровень различия в последовательности рибосомального белка с *Escherichia coli* и некоторых *Enterobacter* spp.; помимо этого у MALDI-ToF MS могут возникнуть проблемы с идентификацией анаэробов на уровне видов. Идентификация микроорганизмов в полимикробных образцах MALDI-ToF MS тоже сложна, хотя некоторые исследования показали, что может быть осуществима [46–47]. Во многих случаях преобладающий микроорганизм среди тех, кто вырос в культуре крови может быть верно идентифицирован.

Неуклонно возрастает частота инвазивных грибковых инфекций, в основном из-за растущего числа пациентов с ослабленным иммунитетом вследствие длительного применения антибиотиков широкого спектра действия. MALDI-ToF MS представляет собой надежный инструмент для повседневной быстрой идентификации клинически значимых грибов. Однако, благодаря своей толстой клеточной стенке, получение высококачественных спектров MALDI-ToF MS грибковых патогенов является более сложным процессом, чем для большинства видов бактерий, и требует оптимизации и стандартизации культурных сред, условий роста и процедур экстракции [49–50]. Для получения достоверного результата клеточная стека грибов должна быть лизирована в 70% муравьиной кислоте и/или механически нарушена.

Применение метода MALDI-ToF MS, помимо ускорения идентификации микроорганизмов, открывает новые перспективы по определению их чувствительности к антибиотикам и противомикотическим средствам [51–52]. Первоначальные исследования проводились на обнаружении продуктов гидролиза беталактамов антибиотиков под действием бетлактамаз. С этой целью сначала производится краткосрочная (1–3 ч) инкубация исследуемой культуры бактерий с тестируемым антибиотиком, после чего, при наличии гидролиза, с помощью MALDI-ToF MS могут быть обнаружены характерные молекулярные ионы, подтверждающие наличие β -лактамаз [53–56]. Также есть разработки по определению чувствительности грибов рода *Candida* к флуконазолу и некоторым другим.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

MALDI-ToF MS обеспечивает новый подход для быстрой, надежной, и рентабельной иден-

тификации микробных агентов [57–59]. Несколько исследований показали, что точность MALDI-ToF MS в определении культуры микроорганизмов сопоставима или превосходит автоматизированные системы, основанные на биохимических и других фенотипических тестах [60–63]. Действительно, в настоящее время многие лаборатории полагаются на MALDI-ToF MS для рутинного распознавания микробных агентов и могут использовать автоматизированные системы определения для подтверждения неизученных штаммов (Low-score), таким образом достигая правильных показателей идентификации бактерий очень близкий результат к 100% в целом [64–66]. В настоящее время разрабатываются и оцениваются другие виды применения MALDI-ToF MS в диагностической микробиологии, такие как анализ прямых проб, прогнозирование устойчивости к противомикробным препаратам и типирование штаммов, изучая возможности и пределы этой технологии [67–69].

ЛИТЕРАТУРА

- Tissari P., Zumla A., Tarkka E., Mero S., Savolainen L., Vaara M., Aittakorpi A., Laakso S., Lindfors M., Piiparinen H., Maki M., Carder C., Huggett J., Gant V. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet*. 2010;375; (9710):224–30.
- Afshari A., Schrenzel J., Ieven M., Harbarth S. Bench-to bedside review: Rapid molecular diagnostics for bloodstream infection — a new frontier *Crit Care*. 2012;16(3):222. doi: 10.1186/cc11202.
- Осипов Г.А., Бойко Н.Б., Новикова В.П., Гриневиц В.Б., Федосова Н.Ф., Цех О.М., Токарева Е.В., Земскова Е.А. Методика масс-спектрометрии микробных маркеров как способ оценки пристеночной кишечной микрофлоры при заболеваниях органов пищеварения. Санкт-Петербург, 2013.
- Gurova M.M., Romanova T.A., Novikova V.P., Avilova I.A. Application of gas chromatography–mass spectrometry for assessment of the condition of intestinal microflora. *Biomedical Engineering*. 2015. Т. 49. № 1. С. 12–14.
- Барышникова Н.В., Гурова М.М., Иванова И.И., Кузьмина Д.А., Мельникова И.Ю., Новикова В.П., Осипов Г.А., Петровский А.Н., Самсонова М.В., Суворов А.Н., Суворова М.А., Успенский Ю.П., Цех О.М., Червинец В.М., Шабалов А.М. Микробиота желудочно-кишечного тракта при хроническом гастрите. Под редакцией А.Н. Суворова, В.П. Новиковой, И.Ю. Мельниковой. Санкт-Петербург, 2014.
- Kumar A., Ellis P., Arabi Y., Roberts D., Light B., Parrillo J.E., Dodek P., Wood G., Kumar A., Simon D., Peters C., Ahsan M., Chateau D. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*. 2009;136(5):1237–48.
- Schmidt V., Jarosch A., März P., Sander C., Vacata V., Kalka-Moll W. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(3):311–7.
- laydon M.A., Davey S.N., Edwards-Jones V. et al. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry // *Nat. Biotechnol*. 1996 Vol. 14. P. 1584–1586.
- Haag A.M., Taylor S.N., Johnston K.H. et al. Rapid identification and speciation of *Haemophilus* bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *J. Mass Spectrom*. 1998. Vol. 33. P. 750–756.
- Vargha M., Takats Z., Koponka A. et al. Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates // *J. Microbiol Methods*. 2006. Vol. 66. P. 399–409.
- Nagy E., Maier T., Urban E. et al. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Clin. Microbiol. Infect*. 2009. Vol. 15. P. 796–802.
- Giebel R., Worden C., Rust S. M. et al. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges // *Adv. Appl. Microbiol*. 2010. Vol. 71. P. 149–184.
- Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications / ed. Richard B. Cole. Second edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010 897 p.
- Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Техносфера, 2015 704 с.
- Вулфсон Н.С., Заикин В.Г., Микая А.И. Масс-спектрометрия органических соединений. М.: Химия, 1986 312 с.
- Hoffman E.De., Charette J., Stroobant V. *Mass Spectrometry. Principles and Applications*. Chichester: John Wiley and Sons. 1996. 340 p.
- Knot P.D., Fisher M.A. *Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratory* // *Clinical Microbiology Newsletter*. — 2012 — Vol. 34, № 17. P. 135–140.
- Mimica M.J., Valle Martino M.D., Pasternak J. MALDI-TOF MS in the clinical microbiology laboratory // *J. Bras. Patol. Med. Lab*. 2013. Vol. 49, № 4. P. 256–259.
- Anhalt J.P., Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry // *Anal. Chem*. 1975. Vol. 47. P. 219–225.
- Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., et al. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2 151–153.
- Holland R.D., Wilkes H.G., Rafii F. et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 1996. Vol. 10. P. 1227–1232.
- Patel R. MALDI-TOF Mass Spectrometry: Transformative Proteomics for Clinical Microbiology // *Clin. Chem*. 2013. Vol. 59, № 2. P. 340–342.
- Fenselau C., Demirev P.A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry // *Mass Spectrom. Rev*. 2001. Vol. 20. P. 157–171.
- Giebel R., Worden C., Rust S.M. et al. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges // *Adv. Appl. Microbiol*. 2010. Vol. 71. P. 149–184.
- Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic

- microbiology // FEMS Microbiol. Rev. 2012. Vol. 36. P. 380–407.
26. Ryzhov V., Fenselau C. (2001). Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal. Chem.* 73 746–750.
 27. Richter C., Hollstein S., Woloszyn J., Kaase M., Gatermann S. G., Szabados F. (2012). Evaluation of species-specific score cut-off values for various *Staphylococcus* species using a MALDI Biotyper-based identification. *J. Med. Microbiol.* 61 1409–1416.
 28. Szabados F., Tix H., Anders A., Kaase M., Gatermann S. G., Geis G. (2012). Evaluation of species-specific score cutoff values of routinely isolated clinically relevant bacteria using a direct smear preparation for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry-based bacterial identification. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31 1109–1119.
 29. Barnini S., Ghelardi E., Brucculeri V., Morici P., Lupetti A. (2015). Rapid and reliable identification of Gram-negative bacteria and Gram-positive cocci by deposition of bacteria harvested from blood cultures onto the MALDI-TOF plate. *BMC Microbiol.*
 30. Dupont C., Sivadon-Tardy V., Bille E., Dauphin B., Berrutti J. L., Alvarez A. S., et al. (2010). Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin. Microbiol. Infect.*
 31. Guo L., Ye L., Zhao Q., Ma Y., Yang J., Luo Y. (2014). Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *J. Thorac. Dis.*
 32. Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P., et al. (2010). Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J. Clin. Microbiol.*
 33. Marko D.C., Saffert R.T., Cunningham S.A., Hyman J., Walsh J., Arbefeville S. et al. (2012). Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.*
 34. Martiny D., Busson L., Wybo I., El Haj R. A., Dediste A., Vandenberg O. (2012). Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*
 35. Alby K., Gilligan P.H., Miller M.B. (2013). Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms for the identification of gram-negative rods from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.*
 36. Karpanoja P., Haruju I., Rantakokko-Jalava K., Haanpera M., Sarkkinen H. (2014). Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of viridans group streptococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*
 37. Lévesque S., Dufresne P. J., Soualhine H., Domingo M. C., Bekal S., Lefebvre B., et al. (2015). A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory.
 38. Seng P., Drancourt M., Couriet F., La Scola B., Fournier P. E., Roalian J. M., et al. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.
 39. Carrasco G., de Dios Caballero J., Garrido N., Valdezate S., Cantón R., Sáez-Nieto J.A. (2016). Shortcomings of the commercial MALDI-TOF MS database and use of MLSA as an arbiter in the identification of *Nocardia* species.
 40. Marín M., Cercenado E., Sánchez-Carrillo C., Ruiz A., Gómez González Á., Rodríguez-Sánchez B., et al. (2017). Accurate differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from other species within the *Streptococcus mitis* group by peak analysis using MALDI-TOF MS.
 41. El Khechine A., Couderc C., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. (2011). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice.
 42. Wieser A., Schneider L., Jung J., Schubert S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review).
 43. Cao Y., Wang L., Ma P., Fan W., Gu B., Ju S. (2018). Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of mycobacteria: a systematic review and meta-analysis.
 44. Park J. S., Choi S. H., Hwang S.M., Hong Y.J., Kim T.S., Park K.U., et al. (2016). The impact of protein extraction protocols on the performance of currently available MALDI-TOF mass spectrometry for identification of mycobacterial clinical isolates cultured in liquid media. *Clin. Chim. Acta* 460 190–195.
 45. Moreno E., Miller E., Miller E., Totty H., Deol P. (2018). A novel liquid media mycobacteria extraction method for MALDI-TOF MS identification using VITEK® MS. *J. Microbiol. Methods* 144 128–133.
 46. Elbehiry A., Marzouk E., Hamada M., Al-Dubaib M., Al-yamani E., Moussa I. M. (2017). Application of MALDI-TOF MS fingerprinting as a quick tool for identification and clustering of foodborne pathogens isolated from food products. *New Microbiol.* 40 269–278.
 47. Rodríguez-Sánchez B., Alcalá L., Marín M., Ruiz A., Alonso E., Bouza E. (2016). Evaluation of MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry) for routine identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe* 42 101–107.
 48. Benedict K., Richardson M., Vallabhaneni S., Jackson B.R., Chiller T. (2017). Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks. *Lancet Infect. Dis.* 17 e403–e411.
 49. Pana Z. D., Roilides E., Warris A., Groll A.H., Zaoutis T. (2017). Epidemiology of invasive fungal disease in children. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, Vol. 6, Issue. suppl_1, p. S3.
 50. Idelevich E. A., Grünastel B., Becker K. (2016). Rapid detection and identification of candidemia by direct blood culturing on solid medium by use of lysis-centrifugation method combined with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *J. Clin. Microbiol.* 55 97–100.
 51. Kostrzewa M., Sparbier K., Maier T., Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms // *Proteomics Clin. Appl.* 2013. Vol. 7, № 11–12. P. 767–778.
 52. Lavigne J.-P., Espinal P., Dunyach-Remy C. et al. Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? // *Clin. Chem. Lab Med.* — 2013 — Vol. 51, № 2 — P. 257–270.
 53. Burckhardt I., Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours // *J. Clin. Microbiol.* 2011. Vol. 49. P. 3321–3324.

54. Hooff G.P., van Kampen J.J., Meesters R.J. et al. Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry // *J. Proteome Res.* 2012. Vol. 11:79. P. 84
55. Hrabak J., Walkova R., Studentova V. et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // *J. Clin. Microbiol.* 2011. Vol. 49. P. 3222–3227.
56. Camara J.E., Hays F.A. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. Vol. 389. P. 1633–1638.
57. Wybo I., De Bel A., Soetens O. et al. Differentiation of *cfiA*-negative and *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // *J. Clin. Microbiol.* 2011. Vol. 49. P. 1961–1964.
58. Sandalakis V., Psaroulaki A., De Bock P.J. et al. Investigation of rifampicin resistance mechanisms in *Brucella abortus* using MS-driven comparative proteomics // *J. Proteome Res.* 2012. Vol. 11. P. 2374–2385.
59. Cai J. C., Hu Y.Y., Zhang R. et al. Detection of OmpK36 porin loss in *Klebsiella* spp. by Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry // *J. Clin. Microbiol.* 2012. Vol. 50. P. 2179–2182.
60. Bittar F., Ouchenane Z., Smati F. et al. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009. Vol. 34. P. 467–470.
61. Szabados F., Becker K., von Eiff C. et al. The matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based protein peaks of 4448 and 5302 Da are not associated with the presence of Pantone-Valentine leukocidin // *Int. J. Med. Microbiol.* 2011. Vol. 301. P. 58–63.
62. Hrabak J., Chudackova E., Walkova R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis // *Clin. Microbiol. Rev.* 2013. Vol. 26, № 1. P. 103–114.
63. Huang A.M., Newton D., Kunapuli A. et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia // *Clin. Infect. Dis.* 2013. Vol. 57, № 9. P. 1237–1245.
64. Kiehntopf M., Schmerler D., Brunkhorst F.M. et al. Mass spectrometry-based protein patterns in the diagnosis of sepsis / systemic inflammatory response syndrome // *Shock.* 2011. Vol. 36. P. 560–569
65. Van Belkum A., Welker M., Erhard M. et al. Biomedical mass spectrometry in today's and tomorrow's clinical microbiology laboratory // *J. Clin. Microbiol.* 2012. Vol. 50. P. 1513–1517.
66. Kempf M., Bakour S., Flaudrops C. et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. P. E31676.
67. Sparbier K., Schubert S., Weller U. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics // *J. Clin. Microbiol.* 2012. Vol. 50. P. 927–937.
68. Han X., Hu Q., Ding S. et al. Identification and immunological characteristics of chaperonin GroEL in *Riemerella anatipestifer* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. Vol. 93. P. 1197–1205.
69. Kothari A., Morgan M., Haake D.A. Emerging technologies for rapid identification of pathogens // *Clin. Infect. Dis.* 2014. Vol. 59, № 2. P. 272–278.