УДК 616-079
DOI: https://doi.org/10.17816/brmma87432

АНАЛИЗ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДИК И СРЕДСТВ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОБНЫХ ТОКСИНОВ, ИНГИБИРУЮЩИХ СИНТЕЗ БЕЛКА В КЛЕТКЕ

О.А. Митева, Н.С. Юдина, В.А. Мясников, А.В. Степанов, С.В. Чепур

Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Патогенные микроорганизмы и продукты их метаболизма, бактериальные белковые экзотоксины, относят к одним из основных источников биологической угрозы. Микробные токсины обладают высокой активностью и чрезвычайно опасны для человека. Задача быстрого определения следовых количеств таких соединений остается актуальной как в области здравоохранения, так и секторе биологической защиты. Своевременная качественная и количественная специфическая индикация биотоксинов представляет собой ключевую составляющую в постановке диагноза, а также проведении лечебных и профилактических мероприятий. Анализируется современное состояние и перспективы развития в области создания средств специфической индикации микробных токсинов, нарушающих в клетке процессы синтеза белка. Кратко излагаются современные представления о структуре и механизме действия указанных токсинов. Рассмотрены возможности, а также сравниваются преимущества и недостатки классических традиционных и современных инновационных методик идентификации бактериальных токсинов, ингибирующих синтез белка в клетке, и дана их классификация. Приведены примеры использования различных подходов для выявления наиболее значимых представителей данной группы как в клиническом материале, так и в объектах окружающей среды, включая регламентированные. Представлен перечень современных отечественных и зарубежных разработок в области специфической индикации микробных токсинов, ингибирующих синтез белка. В рамках обзора суммированы результаты исследований, определяющих выбор актуальных направлений в области разработки средств и методов быстрой специфической индикации микробных токсинов данной группы. Проанализированы основные тенденции в области создания новых средств токсикологического скрининга как части эффективной национальной системы мониторинга биологических угроз. Определены перспективы разработки и внедрения на рынок отечественных тест-систем и платформ автоматического анализа для выявления бактериальных токсинов в объектах окружающей среды и биологическом материале.

Ключевые слова: методики лабораторной диагностики; микробные токсины; специфическая индикация; токсикологический скрининг; синтез белка; биологический материал; мониторинг биологических угроз.

Как цитировать:
Митева О.А., Юдина Н.С., Мясников В.А., Степанов А.В., Чепур С.В. Анализ современных методик и средств выявления и идентификации микробных токсинов, ингибирующих синтез белка в клетке // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2021. Т. 24, № 1. С. 143–154. DOI: https://doi.org/10.17816/brmma87432

Рукопись получена: 09.11.2021 **Рукопись одобрена:** 28.02.2022 **Опубликована:** 20.03.2022

ЭКО•ВЕКТОР

Все права защищены
© Эко-Вектор, 2022

DOI: https://doi.org/10.17816/brmma87432

MODERN METHODS OF DETECTION AND IDENTIFICATION OF MICROBIAL TOXINS THAT INHIBIT PROTEIN SYNTHESIS IN CELLS

O.A. Miteva, N.S. Yudina, V.A. Myasnikov, A.V. Stepanov, S.V. Chepur

State Research and Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT: Pathogenic microorganisms and products of their metabolism, namely, bacterial protein exotoxins, are considered one of the main sources of biological threat. Microbial toxins are highly active and extremely dangerous to humans. Determining trace amounts of such compounds remains relevant in healthcare and biological protection sector. Timely qualitative- and quantitative-specific indication of biotoxins is a key component in the diagnosis and implementation of therapeutic and preventive measures. Pathogenic microorganisms and products of their metabolism, bacterial protein exotoxins, are considered one of the main sources of biological threat. Microbial toxins are highly active and extremely dangerous to humans. Determining trace amounts of such compounds remains relevant in healthcare and biological protection sector. Timely qualitative- and quantitative-specific indication of biotoxins is a key component in the diagnosis and implementation of therapeutic and preventive measures. The current state and prospects of development in formulating specific indications of microbial toxins that disrupt protein synthesis in cells are analyzed. Modern ideas about the structure and mechanism of action of these toxins are briefly presented. Possibilities were considered, the advantages and disadvantages of classical traditional and modern innovative methods for identifying bacterial toxins that inhibit protein synthesis in cells were compared, and classifications were provided. Examples of the use of various approaches to identify the most significant representatives of this group in both clinical material and in environmental objects, including regulated ones, were given. The review also listed modern domestic and foreign developments in formulating specific indications of microbial toxins inhibiting protein synthesis. The review summarizes the results of studies to determine the current directions in the development of tools and methods for rapid specific indication of microbial toxins. The main trends in the creation of new methods of toxicological screening as part of an effective national system for monitoring biological threats were analyzed. Prospects for the development and introduction to the market of domestic test systems and automatic analysis platforms for the detection of bacterial toxins in environmental objects and biological material were determined.

Keywords: laboratory diagnostic techniques; microbial toxins; specific indication; toxicological screening; protein synthesis; biological material; monitoring of biological threats.

To cite this article:
Miteva OA, Yudina NS, Myasnikov VA, Stepanov AV, Chepur SV. Modern methods of detection and identification of microbial toxins that inhibit protein synthesis in cells. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy.* 2022;24(1):143–154. DOI: https://doi.org/10.17816/brmma87432

Received: 09.11.2021 **Accepted:** 28.02.2022 **Published:** 20.03.2022

ECO•VECTOR

All rights reserved
© Eco-Vector, 2022

Инфекционные заболевания с явно выраженным токсическим компонентом широко распространены в человеческой популяции. В этом случае токсин, как правило, определяет основные клинические симптомы, а также выраженность и тяжесть инфекции [1]. Основная масса известных на сегодняшний день биотоксинов представлена дериватами микроорганизмов, животных, растений, и других форм жизни. Вместе с тем их подлинная роль в природе изучена не до конца. Согласно биологическим мишеням воздействия выделяют нейротоксины, гепатотоксины, нефротоксины, гемотоксины и так далее. Кроме того, современные токсины классифицируют и по структуре, согласно которой их можно разделить на небелковые и белковые [2–4].

Общей характеристикой описанных белковых токсинов признается многообразие и тяжесть вызываемых ими патологических состояний при действии в ничтожно малых концентрациях [1, 5]. Клиническая картина поражения, как правило, развивается достаточно быстро, порой стремительно. Таким образом, мероприятия защиты должны формироваться либо заблаговременно, посредством введения средств иммунопрофилактики, либо экстренно, посредством использования специфических иммунных сывороток, а в случае отсутствия тех и других — паллиативными средствами (патогенетическими и симптоматическими) [6]. Вместе с тем применение патогенетических и симптоматических средств также не является панацеей в подобных ситуациях, поскольку в своем большинстве они неспецифичны и характеризуются формированием положительного эффекта только в случае раннего (возникновение первых симптомов поражения) введения [7]. В этой связи первостепенное значение приобретает создание новых и совершенствование имеющихся методик и средств быстрого выявления и идентификации токсинов в пробах из объектов окружающей среды и биологического материала.

Предлагаемый обзор посвящен сравнению классических способов детекции микробных токсинов с новыми направлениями в области токсикологического скрининга, занимающего одно из приоритетных мест в системе биологической защиты [8]. Особое внимание уделено методикам индикации и идентификации наиболее опасных токсинов бактериального происхождения, ингибирующих в эукариотической клетке процессы трансляции, так называемого синтеза белка.

В основе функциональной активности микробных токсинов, ингибирующих синтез белка в клетке, лежит блокирование роста полипептидной цепи за счет взаимодействия каталитической субъединицы с целевым субстратом — фактором элонгации 2 (ФЭ2) или рибосомальной рибонуклеиновой кислоты клетки-мишени. Способность модифицировать ФЭ2 описана для дифтерийного, холерного, синегнойного и коклюшного экзотоксинов [9]. И, хотя их транспортные субъединицы (субъединицы B) имеют сродство к разным рецепторам на поверхности клеток-мишеней, каталитические субъединицы (субъединицы A) обладают общей для всех аденозиндифосфатрибозилтрансферазной активностью [10]. Механизм действия, определяющий функциональную активность шигатоксинов (веро-, Stx-токсинов) *Shigella dysenteriae* и шигаподобных токсинов STEC штаммов *Escherichia coli* (Shiga Toxin-producing *E. coli*), основан на депуринизации самих рибосом клетки-хозяина [11]. Все упомянутые соединения входят в те или иные перечни и списки наиболее значимых агентов биологической опасности.

С точки зрения решений, разработанных для поиска целевого вещества, аналитические методики можно разделить на две группы. Первая объединяет различные формы прямого анализа, подобно биопробе на моделях чувствительных лабораторных животных или токсикологическому скринингу *in vitro* с использованием перевиваемых клеточных линий. Второй блок представлен опосредованными, непрямыми методиками, направленными на выявление организма, продуцирующего токсин. Так, классическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) или ее модификации, позволяют детектировать в образце присутствие генетического материала токсинобразующих продуцентов, а не сам продукт метаболизма.

Биологическая проба на экспериментальных моделях лабораторных животных является классической методикой индикации токсинов. Данная методика специфической индикации продолжает использоваться и в настоящее время в отношении шигатоксинов, ботулинических, гангренозных, сибиреязвенного, дифтерийного токсина и ряда других [1, 2]. Кроме того, в последнее время всё активнее применяют скрининг с использованием клеточных линий. Так, например, *in vivo* скрининг шига- и шигаподобных токсинов *S. dysenteriae* и *E. coli* группы STEC принято осуществлять на лабораторных линиях белых мышей, а *in vitro* — заражением чувствительной культуры клеток линии Vero. Однако интерпретировать результаты этих исследований следует с большой осторожностью. Для *E. coli* характерно проявление нестабильности генов, отвечающих за продукцию шигатоксинов: при контакте с факторами иммунитета и антибиотиками или в процессе культивирования они могут спонтанно утрачивать их. Кроме того, встает вопрос специфичности пробы, так как шигатоксины способны продуцировать и другие бактерии: *Campylobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Pseudomonas* spp. и *Edwardsiella* spp. [12]. Для обнаружения экзотоксина A (ExoA), продуцируемого *P. aeruginosa*, используют тест «дилятации кишечника» на мышах-сосунках, плантарную и кожную пробы [13]. Вместе с тем эти методики не исключают возможности гибели экспериментальных животных от других, также секретируемых *P. aeruginosa,* факторов вирулентности. Другим примером использования описанных способов является выявление дифтерийного токсина у коринебактерий.

Использование классической методики нейтрализации трудоемко и требует длительного времени для постановки

анализа, как и все токсикологические исследования, проводимые на животных. Исследования, выполненные на культуре клеток Vero, дают результаты, сопоставимые с полученными при постановке кожной пробы на кроликах, но также требуют нескольких дней для получения достоверного заключения. Таким образом, при всей информативности и объективности вышеописанных методик их важнейшими недостатками являются: длительность получения результата, зависимость от определенного вида биологических моделей (чувствительной линии животных или линии клеток), обязательное подтверждение результатов биопробы исследованием клинического материала на наличие того или иного токсина или специфических патоморфологических изменений [14].

Микробиологические методики, относящиеся к категории косвенных аналитических методик индикации и идентификации токсинов, по-прежнему остаются «золотым стандартом» для обнаружения токсинопродуцирующих микроорганизмов, так как прежде всего направлены на выявление возбудителя, а не целевого соединения. К их недостаткам можно отнести сам процесс культивирования исследуемого материала, отличающийся трудоемкостью, продолжительностью по времени, эффективностью только в отношении жизнеспособных микроорганизмов в образце, а также определенным негативным влиянием нормальной микрофлоры на бактерии-продуценты биотоксинов, заключающимся в маскировке присутствия последних в исследуемой пробе. При интерпретации результатов клинического анализа необходимо учитывать способность нормальной микрофлоры эффективно маскировать присутствие болезнетворных штаммов, а также возможность обнаружения лишь жизнеспособных форм микроорганизмов.

Для нивелирования этих недостатков, как правило, используют обогащенные среды, состоящие из селективных добавок (новобиоцин, акрифлавин или комбинацию ванкомицина, цефсулодина и цефиксима; комбинацию ванкомицина с теллуритом калия, новобиоцин в комплексе с ванкомицином, теллуритом калия и цефиксимом). Использование обогащенных сред позволяет более эффективно выявлять STEC-штаммы кишечной палочки серотипов O111, O26 и др., поскольку они ферментируют сорбит, в результате чего колонии приобретают характерную цветовую окраску, отличающую их от других возбудителей [15]. Помимо обогащенных сред применяют дифференциально-диагностические среды (Unipath и др.), преимущественно для выявления энтерогемолизинов, продуцируемых 90% штаммов STEC. Использование хромогенных сред (Fluorocult *E. coli* O157, Rainbow O157 и др.) позволяет сократить время идентификации изолятов STEC по выявлению β-D-глюкуронидазы/β-D-галактозидазы [16]. Вместе с тем, использование селективных сред для выявления и идентификации продуцентов токсинов также не решает всех негативных моментов микробиологического индикационного подхода. В этом аспекте необходимо учитывать генетическую нестабильность продуцентов (в частности, энтеробактерий), определенную генотипическую и фенотипическую схожесть продуцентов, например, шигаподобных токсинов с комменсальными штаммами *E. coli*.

Микробиологический подход остается «золотым стандартом» при выявлении *P. aeruginosa* и продуктов ее жизнедеятельности, со всеми ограничениями и преимуществами, свойственными данной методике. Для идентификации, типирования и оценки патогенного потенциала упомянутого возбудителя с применением микробиологического анализа разработаны диагностические системы, основанные на детекции его биохимической активности «НЕФЕРМ-тест 12/24» фирмы «Lachema» (Чехия), API NFT/API 20 NE фирмы «BioMerieux» (Франция), RapID NF Plus фирмы «IDS» (США). Учет результатов осуществляют визуально либо с помощью специфических ридеров. Объективность микробиологического подхода при выявлении и идентификации продуцентов во многом зависит от состояния среды культивирования [17, 18].

Схемы бактериологической диагностики дифтерии, применяемые в России для выявления токсигенных штаммов коринебактерий, признаны достаточно эффективными и информативными. Их перечень включает постановку пробы на токсигенность, позволяющую выявить продукцию дифтерийного токсина возбудителем, и определение цистиназной активности, с последующей оценкой биохимических свойств. Специфические колонии возбудителя оценивают по культуральным, морфологическим и биохимическим признакам, руководствуясь действующими нормативными и методическими документами [19, 20]. С целью выявления различий между различными видами коринебактерий определяют интраредуктазную и уреазную их активность. Максимально быстро результат может быть получен не ранее чем на 3-и сутки после постановки анализа, занимающего в среднем около 5 сут. Вместе с тем нельзя не признать, что объективность получаемого конечного результата зависит от качества питательной среды и других реагентов, условий их приготовления и хранения, квалификации персонала, что, в основном, проявляется в своевременности и правильности взятия материала на исследование и соблюдении сроков и требований его доставки в исследовательскую лабораторию.

Таким образом, при выявлении и идентификации токсинов микробного происхождения классическими микробиологическими методиками их нельзя признать в полной степени достаточными для получения объективных результатов анализа. Следовательно, в системе специфической индикации биотоксинов классические методики должны в обязательном порядке дополняться иммунологическими (в том числе серологическими) и/или молекулярно-генетическими.

DOI: https://doi.org/10.17816/brmma87432

Серологические методики индикации и идентификации токсинов микробного происхождения основаны на комплементарном взаимодействии специфических антител с соответствующим соединением, они общепризнаны, достаточно надежны и характеризуются удовлетворительной чувствительностью и специфичностью. Наиболее распространенными среди них являются реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) с иммуноглобулиновыми эритроцитарными диагностикумами и радиоиммунный анализ (РИА). В 1960–1970 гг. вышеперечисленные методики широко использовались для индикации и идентификации биопатогенов и продуцируемых ими токсинов и ферментов [7, 21]. С появлением более современных диагностических приемов, отличающихся чувствительностью, специфичностью и экспрессностью в получении результатов, РНГА и РИА стали реже применяться в диагностической практике. Более того, РИА к настоящему времени полностью вытеснен более безопасным и не менее чувствительным твердофазным иммуноферментным анализом (ТИФА).

В Российской Федерации (РФ) по-прежнему используют реакцию латексной агглютинации, в частности при выявлении шига- и шигаподобных биотоксинов *S. dysenteriae* и *E. coli* из группы STEC, преимущественно серотипа O157:H7. Типирование ведется по соматическому и жгутиковому антигенам, что дает возможность дифференцировать возбудитель серотипа O157:H7 от возбудителей других серотипов группы. При этом, несмотря навысокую скорость выполнения анализа, методика не лишена недостатков, основным из которых является не высокая специфичность. При проведении реакции необходимо учитывать, что антиген H7 присутствует не только у микробов серотипа O157, но и групп O1, O18 и O55 *E. coli.* Кроме того, возможны перекрестные реакции между соматическими антигенами 50, 116 и 157. Следовательно, вероятность получения ложноположительных результатов обусловливает необходимость в дополнение к серологическим методикам использовать классический микробиологический подход для повышения объективности анализа.

Иммунологические подходы при индикации и идентификации токсинов микробного происхождения ограничиваются в основном иммунофлюоресцентным (МФА) и иммуноферментным (ИФА) анализами [1]. Первый преимущественно применяется для выявления продуцентов, второй — собственно токсина. В основе МФА лежит реакция искомого микроорганизма с люминесцирующим иммуноглобулином, меченным специфическими красителями — флюорохромами. Образующийся комплекс «антиген — флюоресцирующее антитело» приобретает способность светиться в синих и ультрафиолетовых лучах спектра. Основное преимущество МФА — возможность быстрого выявления, локализации и идентификации биопатогена-продуцента в препаратах, окрашенных гомологичными флюоресцирующими иммуноглобулинами. Использование МФА в течение 1–2 ч позволяет обнаружить не только жизнеспособные клетки микроорганизма, но и нежизнеспособные клетки, содержащиеся в препарате. К недостаткам МФА следует отнести обязательное наличие в лаборатории высокоразрешающей оптической техники, а также определенных навыков у персонала, осуществляющего интерпретацию результатов.

ИФА рассматривают как высокоспецифичную и высокочувствительную методику, позволяющую выявлять как рекомбинантные, так и нативные экзотоксины (ботулинические, гангренозные, дифтерийные, столбнячный и др.). Первые иммунологические пробы для выявления токсигенных штаммов *P. aeruginosa*, с использованием поликлональных антител, предложены еще в 1980-х гг. Эритроцитарный диагностикум на основе формалинизированных эритроцитов кур и аффинноочищенных поликлональных иммунноглобулинов (Ig) G к экзотоксину A обеспечивал выявление его в концентрации 1,2 нг/мл [22].

Многие иммуноферментные диагностикумы основаны на поликлональных IgG кролика, сорбированных на твердую фазу или козьих поликлональных IgG, меченных пероксидазой хрена [23]. Помимо пероксидазы хрена в качестве метки используют биотин, дигоксигенин, наночастицы коллоидного золота и серебра [24]. Вместе с те, использование в дизайне системы поликлональных антител влечет за собой проблему неспецифичности, тем самым привнося в результаты анализа определенную погрешность и вызывая ложноположительные результаты. Решение данной проблемы было найдено после создания гибридомной технологии, обеспечивающей наработку моноклональных антител различной эпитопной направленности, что позволило создать более специфичные тест-системы. В качестве примеров реализации подобного подхода можно привести набор реагентов «Pseudomonas Exotoxin A, ELISA Kit» фирмы Cusabio Biotech (Китай) с пределом чувствительности 0,156 нг/мл и специфичностью 99%, позволяющий определять нативный ExoA в клинических материалах слюны, плазмы крови, а также других биологических жизкостях организма. Не менее чувствительным является набор реагентов «Immunotag™ Human PEA ELISA» фирмы «G Biosciences» (США).

До недавнего времени применение ИФА для выявления и идентификации различных подтипов шига- и шигаподобных токсинов было ограниченным ввиду наличия перекрестных реакций и получения в связи с этим ложноположительных и ложноотрицательных результатов [25]. Ситуацию удалось исправить за счет получения более аффинных антител ко всем известным подтипам шигатоксинов, использование которых в ИФА тест-системах позволило существенно повысить их специфичность при проведении индикационных мероприятий [26]. В качестве примера можно привести тест-системы «ELISA kit Shigatoxin1/Shigatoxin2» фирмы «R-biopharm» (Германия) и «Alere Shiga Toxin Quik Chek Assay» фирмы «Thermo Fisher Scientific» (США).

ИФА тест-системы активно используются при индикации дифтерийного токсина. Эти диагностикумы отличаются более высокой чувствительностью и специфичностью, чем иммунохроматографический тест (ICS-тест), иммунопреципитация в агаре (Elek-тест), РНГА и реакция латекс-агглютинации. Однако параметры чувствительности и специфичности данной методики, как правило, варьируют в широком диапазоне, что связано с настройкой калибраторов, поставляемых их производителями. В связи с этим в качестве общих рекомендаций в странах Европейского Союза был принят Международный стандарт, заменяющий собой разнообразные, не сообразующиеся между собой внутренние стандарты производителей коммерческих тест-систем [27].

Успешным направлением разработки иммунологических экспресс-тестов стало конструирование диагностикумов на основе иммунохроматографической методики, с использованием нитроцеллюлозных полосок (в качестве твердой фазы) и меченных коллоидным золотом моноклональных антител [2]. В настоящее время подобные тест-системы используются, в частности, при идентификации экзотоксинов типа А и В, выделяемых *C. difficile*, вомитоксина, афлатоксина, фумонизинов, зераленона и др. Предпринимаются попытки количественного определения соединений в различных видах проб с использованием данной платформы. Простота и скорость выполнения анализа, высокие чувствительность и специфичность, возможность мультиплексирования выдвинули эту методику в число приоритетных при выявлении токсинов микробного происхождения.

Кроме вышеописанных классических фенотипических подходов принадлежность изолятов к токсигенным штаммам устанавливают с помощью методик молекулярной диагностики. Преимущества их заключаются прежде всего в скорости и стоимости при потоковом анализе. Наибольшее распространение в практике получила ПЦР, которая позволяет достаточно надежно подтвердить присутствие в образце гена-мишени, отвечающего за продукцию токсина [28, 29]. Описаны разнообразные варианты ПЦР-анализа для обнаружения определенных вариантов гена токсигенности *stx*, свойственных клинически значимым серотипам дизентерийного микроба [31]. Более совершенным подходом в настоящее время является петлевая изотермическая полимеразная цепная реакция (изо-ПЦР), позволившая значительно повысить не только чувствительность и специфичность ПЦР-анализа, но и увеличить скорость проведения анализа [32]. Заметим, что изо-ПЦР менее чувствительна к присутствию ингибирующих веществ в исследуемом материале в сравнении со стандартной ПЦР и менее требовательна к техническому оснащению лаборатории. Ее основной недостаток — сложность подбора специфических петлевых праймеров, что существенно ограничивает практическое использование данного подхода.

«VT-screening kits» фирмы «Eiken Chemical» (Япония) является одной из первых разработанных и зарегистрированных тест-систем на основе изо-ПЦР и предназначена для индикации токсинпродуцирующих STEC штаммов *E. coli*) [33, 34]. В настоящее время этот набор реагентов подвергся значительной модификации и позволяет выявлять STEC штаммы как в объектах окружающей среды, так и клинических материалах [35, 36], а кроме того, способен выявить в пробах жизнеспособные, но лишенные способности к культивированию микроорганизмы-продуценты [37, 38].

ПЦР-анализ является надежной и эффективной методикой индикации *P. aeruginosa* и *Corynebacterium* spp., являющихся продуцентами экзотоксина А и дифтерийного токсина соответственно [39–41]. При этом в настоящее время приоритетными в плане разработки и использования являются тест-системы для постановки мультиплексной ПЦР [42, 43]. Использование данных тест-систем позволяет выявить детерминанты вирулентности *P. aeruginosa* и гены, отвечающие за продукцию дифтерийного токсина коринебактериями.

Помимо традиционного ПЦР-анализа применяется изо-ПЦР в виде автоматизированной системы детекции результатов с помощью биосенсора LFNAB, позволяющего выявить присутствие в пробе токсинпродуцирующих *P. aeruginosa* без сложного дорогостоящего оборудования и экспресс-тестов, особенностью которых является верификация токсигенных и атоксигенных штаммов *C. diphtheriae* в клиническом материале [44–46]. Разработаны и внедрены в практику клинических исследований методические приемы на основе «Taqman» и гибридных зондов «LightCycler», характеризующиеся выраженной специфичностью [47–49].

Отдельное положение занимают методики, основанные на детекции продуктов эндопептидазной активности токсинов, служащие для оценки их функциональности. Разработаны FRET-биосенсоры (fluorescence resonance energy transfer), в основе действия которых лежит методика индуктивно-резонансного переноса энергии [50]. Технология использует синтетические олигопептиды — аналоги субстратов, несущие в качестве доноров и акцепторов (гасителей) флуоресценции две метки с двух концов от сайта расщепления. При расщеплении субстрата акцептор флуоресценции отделяется от донора, флуоресценцию которого становится возможным количественно измерить. Существенно повысить чувствительность FRET-биосенсорного определения эндопептидазной активности и снизить помехи, вызванные присутствием примесей в аналите, стало возможным за счет введения этапа иммунной адсорбции [51]. В настоящее время регистрацию эндопептидазной активности токсинов чаще проводят с применением масс-спектрометрии (МС).

Высокодостоверные способы, использующие для определения и углубленной характеристики белковых токсинов технологию высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (Matrix-Assisted Laser Desorption

Ionization — MALDI), представляют собой средства прямого инструментального токсикологического анализа. Так, идентификацию субстанций с использованием времяпролетной масс-спектрометрии с МАЛДИ (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry — MALDI-Tof-MS) осуществляют на основании сравнительного анализа их белковых профилей. Собранные в процессе анализа спектры сравнивают с референтными, присутствующими в базе данных. Прямое белковое профилирование с MALDI-Tof-MS рассматривают в качестве альтернативного подхода, способного предложить быструю, автоматизированную и недорогую (без учета стоимости прибора) методику определения как известных, так и малоизученных биологически опасных соединений. Вместе с тем для MALDI-Tof-MS критическим и существенным фактором, ограничивающим эффективное внедрение данной технологии в повседневную практику, признается необходимость в наличии обширной базы данных, содержащей перечень референтных белковых спектров исследуемых токсинов или их продуцентов. Коммерчески доступные базы, в частности масс-спектрометрической платформы «BioTyper» фирмы «Bruker Daltonics» (Германия), поставляемой в РФ, не содержат спектров возбудителей особо опасных инфекций, что определяет необходимость в создании отечественных референтных баз данных. Кроме того, при детекции бинарных токсинов с применением МС значительные затруднения вызывает пробоподготовка исследуемого аналита. Этот процесс представляет собой наиболее существенный и трудоемкий этап, занимает большую часть времени проведения анализа, и включает в себя различные методы концентрирования и сепарации белка.

Разработаны протоколы, позволяющие использовать MALDI-Tof-MS для выявления, идентификации и количественного определения полноразмерного нативного Stx-токсина, и характеристики его изолированных A- и B-субъединиц [52]. Предложены схемы детекции шигаподобных токсинов на основе технологии ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) [53]. В последнем случае пробоподготовка включает в себя обработку культур токсигенных штаммов с применением митомицина С (ММС), стимулирующего продукцию шигаподобных токсинов.

Идентификацию Stx-токсинов проводят с использованием продуктов прямого гидролиза белков из лизатов или супернанантов бактериальных культур. С улучшением процедуры пробоподготовки и расширением баз данных подобные физико-химические методики смогут применяться в качестве способа быстрого целевого скрининга шига- и шигаподобных токсинов [54]. Также на основе MALDI-Tof-MS разрабатывают методики для идентификации токсигенных штаммов коринебактерий, включая *C. diphtheriae*. Доступны две системы, содержащие коммерческие базы данных, — «Bruker Biotyper» («Bruker Daltonics»), с использованием программного обеспечения «Flex-control», и «VITEK® MS» (bioMerieux) — для определения представителей рода *Corynebacterium* до уровня вида [55–57]. Одиночные и множественные изоляты могут быть исследованы параллельно, что существенно влияет на сроки идентификации, сокращая его до 24–72 ч. При этом аналитическое время оборота пробы составляет около 3 мин на образец. Вместе с тем эта технология, за редкими исключениями, неприменима к пробам клинического материала, поскольку прямой анализ мазка не отработан, что сохраняет необходимость выращивания чистой культуры и дополнительной пробоподготовки [58, 59].

В целом токсикологический скрининг белковых токсинов бактериального происхождения предполагает применение различных подходов, поскольку не существует единой, эффективной, однозначно точной и экономически целесообразной методики для выявления всего спектра этих соединений. В арсенал современного исследователя входит множество методик, от классических микробиологических, фенотипических и серологических до иммуноферментных, молекулярно-генетических и физико-химических методик современной протеомики, различающихся по стоимости, сложности, чувствительности, скорости проведения анализа и специфичности.

На сегодняшний день золотым стандартом в области идентификации белковых токсинов и их продуцентов признается ИФА и молекулярные методики, основанные на амплификации генетического материала организма-продуцента. Одной из наиболее перспективных платформ для автоматизированного инструментального анализа рассматривают методику ВЭЖХ-МС-детектированием в режиме высокого разрешения, которая позволяет анализировать сложные биологические соединения в самых разных матрицах. При этом полного отказа одних методик в пользу других, как правило, не происходит, и специфическая индикация белковых токсинов бактериального происхождения идет по интегративному пути, объединяя все положительные стороны существующих методов, комбинируя и дополняя их в зависимости от определяемого аналита.

Таким образом, на современном этапе представляется оправданным параллельное существование и развитие одновременно двух стратегий в области исследований, посвященной разработке методик детекции и идентификации белковых токсинов. Один подход представлен трудоемкими высокотехнологичными методиками аналитической протеомики, второй обеспечивает создание быстрых скрининговых систем на основе синтеза иммуноферментных и молекулярно-биологических подходов, пригодных для работы в ограниченных условиях или предварительной диагностики. Иммунологические методы наиболее эффективны в рамках скрининговых мультианалитных исследований, тогда как для селективного определения токсичных соединений более перспективным представляется применение физико-химических способов детекции, основанных на электрофоретических, спектрографических и спектрометрических подходах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Магазов Р.Ш., Степанов А.В., Чепур С.В., Савельев А.П. Токсины биологического происхождения (природа, структура, биологические функции и диагностика). Уфа: Башкирская энциклопедия, 2019. С. 213–215.

2. Андрюков Б.Г., Беседнова Н.Н., Калинин А.В., и др. Биологическое оружие и глобальная система биологической безопасности: практическое руководство. Владивосток: Дальнаука, 2017. С. 33–37.

3. Toczyska I., Płusa T. Shiga toxin and tetanus toxin as a potential biologic weapon // Pol Merkur Lekarski. 2015. Vol. 39. No. 231. P. 157–161. PMID: 26449578

4. Wesołowski A., Płusa T. Saxitoxins and tetrodotokxins as a new biological weapon // Pol Merkur Lekarski. 2015. Vol. 39. No. 231. P. 173–175. PMID: 26449582

5. Cao H., Baldini R.L., Rahme L.G. Common mechanisms for pathogens of plants and animals // Annu Rev Phytopathol. 2001. Vol. 39. No. 1. P. 259–284. DOI: 10.1146/annurev.phyto.39.1.259

6. Jamet A., Touchon M., Ribeiro-Gonçalves B., Carriço A. A widespread family of polymorphic toxins encoded by temperate phages // BMC Biol. 2017. Vol. 15. P. 1–12. DOI: 10.1186/s12915-017-0415-1

7. Магазов Р.Ш., Савельев А.П., Чепур, и др. Эпидемиология и профилактика управляемых инфекций. Уфа: Башкирская энциклопедия, 2017. 688 с.

8. do Vale A., Cabanes D., Sousa S. Bacterial toxins as pathogen weapons against phagocytes // Front Microbiol. 2016. Vol. 7. P. 42. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00042

9. Domenighini M., Rappuoli R. Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages // Mol Microbiol. 1996. Vol. 21. No. 4. P. 667–674. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1996.321396.x

10. Armstrong S., Yates S.P., Merrill A.R. Insight into the Catalytic Mechanism of Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A studies of toxin interaction with eukaryotic elongation factor-2 // J Biol Chem. 2002. Vol. 277. No. 48. P. 46669–46675. DOI: 10.1074/jbc.M206916200

11. Audi J. Ricin poisoning. A comprehensive review // JAMA. 2005. Vol. 294. No. 18. P. 2343–2351. DOI: 10.1001/jama.294.18.2342

12. Шагинян И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2, № 3. С. 82–95.

13. Егорова О.Н. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции. Федеральные клинические рекомендации. Москва, 2014. С. 50–56.

14. Zhang X. Military potencial of biological toxins // J Appl Biomed. 2014. Vol. 12. P. 63–77. DOI: 10.1016/j.jab.2014.02.005

15. O'Sullivan J., Bolton D.J., Duffy G. Methods for Detection and Molecular Characterization of Pathogenic Escherichia coli. Pathogenic *E. coli*. Network. Coordination action food. AFRC. Dublin: Ashtown Food Research Centre, 2007. 423 p.

16. Paton J.C., Paton A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections // Clin Microbiol Rev. 1998. Vol. 11. No. 3. P. 450–479. DOI: 10.1128/CMR.11.3.450

17. Deng Q., Barbieri J.T. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins // Annu Rev Microbiol. 2008. Vol. 62. P. 271–288. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162848

18. Davinic M., Carty N.L., Colmer-Hamood J.A., et al. Role of Vfr in regulating exotoxin A production by Pseudomonas aeruginosa // Microbiology. 2009. Vol. 155. No. 7. P. 2265–2273. DOI: 10.1099/mic.0.028373-0

19. Жданов К.В., Аминев Р.М., Белов А.Б., и др. Методические указания по диагностике, лечению и профилактике острого тонзиллита и дифтерии в Вооруженных силах Российской Федерации. Москва: ГВМУ МО РФ, 2019. С. 44–45.

20. Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Кошкина Н.А., и др. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции: методические указания МУК 4.2.3065-13. Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013. С. 23–31.

21. Дятлов И.А. Применение масс-спектрометрии для выявления и идентификации патогенных микроорганизмов и биотоксинов // Бактериология. 2020. Т. 5, № 3. С. 5–7.

22. Дерябин П.Н. Эритроцитарные диагностикумы для выявления экзотоксина A Pseudomonas aeruginosa // Журнал микробиологии. 1989. Т. 2. С. 32–36.

23. Jaffar-Bandjee M.C., Careere J., Bally M., et al. Immunoenzymometric assays for alkaline protease and exotoxin A from Pseudomonas aeruginosa: development and use in detecting exoproteins in clinical isolates // Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1994. Vol. 32. P. 893–899. DOI: 10.1515/cclm.1994.32.12.893

24. Shigematsu T., Suda N., Okuda K., Fukushima J. Reliable enzyme-linked immunosorbent assay systems for pathogenic factors of Pseudomonas aeruginosa alkaline proteinase, elastase, and exotoxin A: a comparison of methods for labeling detection antibodies with horseradish peroxidase // Microbiol Immunol. 2007. Vol. 12. No. 51. P. 1149–1159. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2007.tb04010.x

25. Wu S.Y., Hulme J., An S.S. Recent trends in the detection of pathogenic Escherichia coli O157: H7 // BioChip Journal. 2015. Vol. 9. No. 3. P. 173–181. DOI: 10.1007/s13206-015-9208-9

26. He X., Kong Q., Patfield S., et al. A new immunoassay for detecting all subtypes of Shiga toxins produced by Shiga toxin-producing E. coli in ground beef // PloS one. 2016. Vol. 11. No. 1. ID e0148092. DOI: 10.1371/journal.pone.0148092

27. Zasada A.A., Rastawicki W., Smietanska K., et al. Comparison of seven commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of anti-diphtheria toxin antibodies // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013. Vol. 32. No. 7. P. 891–897. DOI: 10.1007/s10096-013-1823-y

28. Anjum M.F., Jones E., Morrison V., et al. Use of virulence determinants and seropathotypes to distinguish high-and low-risk Escherichia coli O157 and non-O157 isolates from Europe // Epidemiol Infect. 2014. Vol. 142. No. 5. P. 1019–1028. DOI: 10.1017/S0950268813001635

29. Martínez-Castillo A., Muniesa M. Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli // Front Cell Infect Microbiol. 2014. Vol. 4. P. 46. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00046

30. Trevisani M., Mancusi R., Delle don D., et al. Detection of Shiga toxin (Stx)-producing Escherichia coli (STEC) in bovine dairy herds in Northern Italy // Int J Food Microbiol. 2014. Vol. 184. P. 45–49. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.033

31. Anjum M.F., Tucker J.D., Sprigings K.A., et al. Use of miniaturized protein arrays for Escherichia coli O serotyping // CVI. 2006. Vol. 13. No. 5. P. 561–567. DOI: 10.1128/CVI.13.5.561-567.2006
32. Diribe O., North S., Sawyer J., et al. Design and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of Staphylococcus pseudintermedius // J Vet Diagn Invest. 2014. Vol. 26. No. 1. P. 42–48. DOI: 10.1177/1040638713516758
33. Yano A., Ishimaru R., Hujikata R. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic Escherichia coli by loop-mediated isothermal amplification // J Microbiol Methods. 2007. Vol 68. No. 2. P. 414–420. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.09.024
34. Hill J., Beriwal S., Chandra I., et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of Escherichia coli // J Clin Microbiol. 2008. Vol. 46. No. 8. P. 2800–2804. DOI: 10.1128/JCM.00152-08
35. Dong H.J., Cho A.R., Hahn T.W., Cho S. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification assay to detect shiga toxin-producing Escherichia coli in cattle // J Vet Sci. 2014. Vol. 15. No. 2. P. 317–325. DOI: 10.4142/jvs.2014.15.2.317
36. Wang F., Jiang L., Yang Q., et al. Rapid and specific detection of Escherichia coli serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 in ground beef, beef trim, and produce by loop-mediated isothermal amplification // Appl Environ Microbiol. 2012. Vol. 78. No. 8. P. 2727–2736. DOI: 10.1128/AEM.07975-11
37. Yan M., Xu L., Jiang H., et al. PMA-LAMP for rapid detection of Escherichia coli and shiga toxins from viable but non-culturable state // Microbial pathogenesis. 2017. Vol. 105. P. 245–250. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.02.001
38. Ravan H., Amandadi M., Sanadgol N. A highly specific and sensitive loop-mediated isothermal amplification method for the detection of Escherichia coli O157: H7 // Microbial pathogenesis. 2016. Vol. 91. P. 161–165. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.12.011
39. Lavenir R., Jocktane D., Laurent F., et al. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target // J Microbiol Methods. 2007. Vol. 70. No. 1. P. 20–29. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.03.008
40. Motoshima M., Yanagihara K., Fukushima K., et al. Rapid and accurate detection of Pseudomonas aeruginosa by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting gyrB gene // Diagn Microbiol Infect Dis. 2007. Vol. 58. No. 1. P. 53–58. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.007
41. Spilker T., Coenye T., Vandamme P., LiPuma J.J. PCR-based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients // J Clin Microbiol. 2004. Vol. 42. No. 5. P. 2074–2079. DOI: 10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004
42. Wolska K., Szweda P. Genetic features of clinical Pseudomonas aeruginosa strains // Pol J Microbiol. 2009. Vol. 58. No. 3. P. 255–260.
43. Shi H., Trinh Q., Xu W., et al. A universal primer multiplex PCR method for typing of toxinogenic Pseudomonas aeruginosa // Appl Microbiol Biotechnol. 2012. Vol. 95. No. 6. P. 1579–1587. DOI: 10.1007/s00253-012-4277-8
44. Chen Y., Cheng N., Xu Y., et al. Point-of-care and visual detection of P. aeruginosa and its toxin genes by multiple LAMP and lateral flow nucleic acid biosensor // Biosensors and Bioelectronics. 2016. Vol. 81. P. 317–323. DOI: 10.1016/j.bios.2016.03.006
45. Torres L.D., Ribeiro D., Hirata R. Jr., et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of Corynebacterium spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2013. Vol. 108. No. 3. P. 272–279. DOI: 10.1590/S0074-02762013000300003
46. Berger A., Hogardt M., Konrad R., Sing A. Detection methods for laboratory diagnosis of diphtheria. In: Burkovski A., editor. Corynebacterium diphtheriae and related toxigenic species. Springer, Dordrecht, 2014. P. 171–205. DOI: 10.1007/978-94-007-7624-1_9
47. Mancini F., Monaco M., Pataracchia M., et al. Identification and molecular discrimination of toxigenic and nontoxigenic diphtheria Corynebacterium strains by combined real-time polymerase chain reaction assays // Diagn Microbiol Infect Dis. 2012. Vol. 73. No. 2. P. 111–120. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.022
48. De Zoysa A., Efstratiou A., Mann G., et al. Development, validation and implementation of a quadruplex real-time PCR assay for identification of potentially toxigenic corynebacteria // J Med Microbiol. 2016. Vol. 65. No. 12. P. 1521–1527. DOI: 10.1099/jmm.0.000382
49. Борисова О.Ю., Пименова А.С., Чаплин А.В., и др. Ускоренный способ генодиагностики дифтерии на основе изотермальной амплификации для выявления ДНК возбудителя // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2017. № 5. С. 24–32. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-5-24-32
50. Ruge D.R., Dunning M.F., Piazza T.M., et al. Detection of six serotypes of botulinum neurotoxin using fluorogenic reporters // Anal Biochem. 2011. Vol. 411. No. 2. P. 200–209. DOI: 10.1016/j.ab.2011.01.002
51. Bagramyan K., Barash J.R., Arnon S.S., Kalkum M. Attomolar detection of botulinum toxin type A in complex biological matrices // PloS one. 2008. Vol. 3. No. 4. ID e2041. DOI: 10.1371/journal.pone.0002041
52. Martinović T., Andjelković U., Gajdošik M.Š., et al. Foodborne pathogens and their toxins // J Proteomics. 2016. Vol. 147. P. 226–235. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.04.029
53. Cheng K., Sloan A., Li X., et al. Mass spectrometry-based Shiga toxin identification: An optimized approach // J Proteomics. 2018. Vol. 180. P. 36–40. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.06.003
54. Silva C.J., Erickson-Beltran M.L., Skinner C.B., et al. Mass spectrometry-based method of detecting and distinguishing type 1 and type 2 Shiga-like toxins in human serum // Toxins. 2015. Vol. 7. No. 12. P. 5236–5253. DOI: 10.3390/toxins7124875
55. Vila J., Juiz P., Salas C., et al. Identification of clinically relevant Corynebacterium spp., Arcanobacterium haemolyticum, and Rhodococcus equi by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // J Clin Microbiol. 2012. Vol. 50. No. 5. P. 1745–1747. DOI: 10.1128/JCM.05821-11
56. Alatoom A.A., Cazanave C.J., Cunningham S.A., et al. Identification of non-diphtheriae corynebacterium by use of matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // J Clin Microbiol. 2012. Vol. 50. No. 1. P. 160–163. DOI: 10.1128/JCM.05889-11
57. Patel R. MALDI-TOF mass spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology // Clin Chem. 2013. Vol. 59. No. 2. P. 340–342. DOI: 10.1373/clinchem.2012.183558
58. Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology // FEMS Microbiol Rev. 2012. Vol. 36. No. 2. P. 380–407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x
59. Oviaño M., Ingebretsen A., Steffensen A.K., et al. Evaluation of the rapidBACpro® II kit for the rapid identification of microorganisms directly from blood cultures using MALDI-TOF MS // bioRxiv. 2021. [preprint]. DOI: 10.1101/2021.01.25.428200

REFERENCES

1. Magazov RSh, Stepanov AV, Chepur SV, Savel'ev AP. *Toksiny biologicheskogo proiskhozhdeniya (priroda, struktura, biologicheskie funktsii i diagnostika)*. Ufa: Bashkirskaya ehntsiklopediya; 2019. P. 213–215. (In Russ.).

2. Andryukov BG, Besednova NN, Kalinin AV, et al. *Biologicheskoe oruzhie i global'naya sistema biologicheskoi bezopasnosti: prakticheskoe rukovodstvo*. Vladivostok: Dal'nauka; 2017. P. 33–37. (In Russ.).

3. Toczyska I, Płusa T. Shiga toxin and tetanus toxin as a potential biologic weapon. *Pol Merkur Lekarski*. 2015;39(231):157–161. PMID: 26449578

4. Wesołowski A, Płusa T. Saxitoxins and tetrodotokxins as a new biological weapon. *Pol Merkur Lekarski*. 2015;39(231):173–175. PMID: 26449582

5. Cao H, Baldini RL, Rahme LG. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annu Rev Phytopathol*. 2001;39(1):259–284. DOI: 10.1146/annurev.phyto.39.1.259

6. Jamet A, Touchon M, Ribeiro-Gonçalves B, Carriço A. A widespread family of polymorphic toxins encoded by temperate phages. *BMC Biol*. 2017;15:1–12. DOI: 10.1186/s12915-017-0415-1

7. Magazov RSh, Savel'ev AP, Chepur SV, et al. *Ehpidemiologiya i profilaktika upravlyaemykh infektsii*. Ufa: Bashkirskaya ehntsiklopediya; 2017. 688 p. (In Russ.).

8. do Vale A, Cabanes D, Sousa S. Bacterial toxins as pathogen weapons against phagocytes. *Front Microbiol*. 2016;7:42. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00042

9. Domenighini M, Rappuoli R. Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages. *Mol Microbiol*. 1996;21(4):667–674. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1996.321396.x

10. Armstrong S, Yates SP, Merrill AR. Insight into the Catalytic Mechanism of Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A studies of toxin interaction with eukaryotic elongation factor-2. *J Biol Chem*. 2002;277(48):46669–46675. DOI: 10.1074/jbc.M206916200

11. Audi J. Ricin poisoning. A comprehensive review. *JAMA*. 2005;294(18):2343–2351. DOI: 10.1001/jama.294.18.2342

12. Shaginyan IA. Role and Significance of Molecular Methods in Epidemiological Analysis of Nosocomial Infections. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2000;2(3):82–95. (In Russ.).

13. Egorova ON. *Ehpidemiologiya i profilaktika sinegnoinoi infektsii. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii*. Moscow; 2014. P. 50–56. (In Russ.).

14. Zhang X. Military potencial of biological toxins. *J Appl Biomed*. 2014;12:63–77. DOI: 10.1016/j.jab.2014.02.005

15. O'Sullivan J, Bolton DJ, Duffy G. *Methods for Detection and Molecular Characterization of Pathogenic Escherichia coli. Pathogenic E. coli. Network. Coordination action food. AFRC*. Dublin: Ashtown Food Research Centre; 2007. 423 p.

16. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(3):450–479. DOI: 10.1128/CMR.11.3.450

17. Deng Q, Barbieri JT. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62:271–288. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162848

18. Davinic M, Carty NL, Colmer-Hamood JA, et al. Role of Vfr in regulating exotoxin A production by Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology*. 2009;155(7):2265–2273. DOI: 10.1099/mic.0.028373-0

19. Zhdanov KV, Aminev RM, Belov AB, et al. *Metodicheskie ukazaniya po diagnostike, lecheniyu i profilaktike ostrogo tonzillita i difterii v Vooruzhennykh cilakh Rossiiskoi Federatsii*. Moscow: GVMU MO RF; 2019. P. 44–45. (In Russ.).

20. Ezhlova EB, Mel'nikova AA, Koshkina NA, et al. *Laboratornaya diagnostika difteriinoi infektsii: metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.3065-13*. Moscow: Federal'nyi tsentr gigieny i ehpidemiologii Rospotrebnadzora; 2013. P. 23–31. (In Russ.).

21. Dyatlov IA. Primenenie mass-spektrometrii dlya vyyavleniya i identifikatsii patogennykh mikroorganizmov i biotoksinov. *Bacteriology*. 2020;5(3):5–7. (In Russ.).

22. Deryabin PN. Ehritrotsitarnye diagnostikumy dlya vyyavleniya ehkzotoksina A Pseudomonas aeruginosa. *Zhurnal mikrobiologii*. 1989;2:32–36. (In Russ.).

23. Jaffar-Bandjee MC, Careere J, Bally M, et al. Immunoenzymometric assays for alkaline protease and exotoxin A from Pseudomonas aeruginosa: development and use in detecting exoproteins in clinical isolates. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1994;32:893–899. DOI: 10.1515/cclm.1994.32.12.893

24. Shigematsu T, Suda N, Okuda K, Fukushima J. Reliable enzyme-linked immunosorbent assay systems for pathogenic factors of Pseudomonas aeruginosa alkaline proteinase, elastase, and exotoxin A: a comparison of methods for labeling detection antibodies with horseradish peroxidase. *Microbiol Immunol*. 2007;12(51):1149–1159. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2007.tb04010.x

25. Wu SY, Hulme J, An SS. Recent trends in the detection of pathogenic Escherichia coli O157: H7. *BioChip Journal*. 2015;9(3):173–181. DOI: 10.1007/s13206-015-9208-9

26. He X, Kong Q, Patfield S, et al. A new immunoassay for detecting all subtypes of Shiga toxins produced by Shiga toxin-producing E. coli in ground beef. *PloS one*. 2016;11(1):e0148092. DOI: 10.1371/journal.pone.0148092

27. Zasada AA, Rastawicki W, Smietanska K, et al. Comparison of seven commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of anti-diphtheria toxin antibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(7):891–897. DOI: 10.1007/s10096-013-1823-y

28. Anjum MF, Jones E, Morrison V, et al. Use of virulence determinants and seropathotypes to distinguish high-and low-risk Escherichia coli O157 and non-O157 isolates from Europe. *Epidemiol Infect*. 2014;142(5):1019–1028. DOI: 10.1017/S0950268813001635

29. Martínez-Castillo A, Muniesa M. Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:46. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00046

30. Trevisani M, Mancusi R, Delle don D, et al. Detection of Shiga toxin (Stx)-producing Escherichia coli (STEC) in bovine dairy herds in Northern Italy. *Int J Food Microbiol*. 2014;184:45–49. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.033

31. Anjum MF, Tucker JD, Sprigings KA, et al. Use of miniaturized protein arrays for Escherichia coli O serotyping. *CVI*. 2006;13(5):561–567. DOI: 10.1128/CVI.13.5.561-567.2006

32. Diribe O, North S, Sawyer J, et al. Design and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of Staphylococcus pseudintermedius. *J Vet Diagn Invest*. 2014;26(1):42–48. DOI: 10.1177/1040638713516758
33. Yano A, Ishimaru R, Hujikata R. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic Escherichia coli by loop-mediated isothermal amplification. *J Microbiol Methods*. 2007;68(2):414–420. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.09.024
34. Hill J, Beriwal S, Chandra I, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of Escherichia coli. *J Clin Microbiol*. 2008;46(8):2800–2804. DOI: 10.1128/JCM.00152-08
35. Dong HJ, Cho AR, Hahn TW, Cho S. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification assay to detect shiga toxin-producing Escherichia coli in cattle. *J Vet Sci*. 2014;15(2):317–325. DOI: 10.4142/jvs.2014.15.2.317
36. Wang F, Jiang L, Yang Q, et al. Rapid and specific detection of Escherichia coli serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 in ground beef, beef trim, and produce by loop-mediated isothermal amplification. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(8): 2727–2736. DOI: 10.1128/AEM.07975-11
37. Yan M, Xu L, Jiang H, et al. PMA-LAMP for rapid detection of Escherichia coli and shiga toxins from viable but non-culturable state. *Microbial pathogenesis*. 2017;105:245–250. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.02.001
38. Ravan H, Amandadi M, Sanadgol N. A highly specific and sensitive loop-mediated isothermal amplification method for the detection of Escherichia coli O157: H7. *Microbial pathogenesis*. 2016;91:161–165. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.12.011
39. Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, et al. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *J Microbiol Methods*. 2007;70(1):20–29. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.03.008
40. Motoshima M, Yanagihara K, Fukushima K, et al. Rapid and accurate detection of Pseudomonas aeruginosa by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting gyrB gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58(1):53–58. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.007
41. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2004;42(5):2074–2079. DOI: 10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004
42. Wolska K, Szweda P. Genetic features of clinical Pseudomonas aeruginosa strains. *Pol J Microbiol*. 2009;58(3):255–260.
43. Shi H, Trinh Q, Xu W, et al. A universal primer multiplex PCR method for typing of toxinogenic Pseudomonas aeruginosa. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;95(6):1579–1587. DOI: 10.1007/s00253-012-4277-8
44. Chen Y, Cheng N, Xu Y, et al. Point-of-care and visual detection of P. aeruginosa and its toxin genes by multiple LAMP and lateral flow nucleic acid biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;81: 317–323. DOI: 10.1016/j.bios.2016.03.006
45. Torres LD, Ribeiro D, Hirata R Jr, et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of Corynebacterium spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108(3): 272–279. DOI: 10.1590/S0074-02762013000300003
46. Berger A, Hogardt M, Konrad R, Sing A. Detection methods for laboratory diagnosis of diphtheria. Burkovski A., editor. *Corynebacterium diphtheriae and related toxigenic species*. Springer, Dordrecht; 2014. P. 171–205. DOI: 10.1007/978-94-007-7624-1_9
47. Mancini F, Monaco M, Pataracchia M, et al. Identification and molecular discrimination of toxigenic and nontoxigenic diphtheria Corynebacterium strains by combined real-time polymerase chain reaction assays. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(2):111–120. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.022
48. De Zoysa A, Efstratiou A, Mann G, et al. Development, validation and implementation of a quadruplex real-time PCR assay for identification of potentially toxigenic corynebacteria. *J Med Microbiol*. 2016;65(12):1521–1527. DOI: 10.1099/jmm.0.000382
49. Borisova OYu, Pimenova AS, Chaplin AV, et al. An accelerated method of diphtheria gene diagnostics based on isothermal amplification to detect DNA of the causative agent. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2017;(5):24–32. (In Russ.). DOI: 10.36233/0372-9311-2017-5-24-32
50. Ruge DR, Dunning MF, Piazza TM, et al. Detection of six serotypes of botulinum neurotoxin using fluorogenic reporters. *Anal Biochem*. 2011;411(2):200–209. DOI: 10.1016/j.ab.2011.01.002
51. Bagramyan K, Barash JR, Arnon SS, Kalkum M. Attomolar detection of botulinum toxin type A in complex biological matrices. *PloS one*. 2008;3(4):e2041. DOI: 10.1371/journal.pone.0002041
52. Martinović T, Andjelković U, Gajdošik MŠ, et al. Foodborne pathogens and their toxins. *J Proteomics*. 2016;147:226–235. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.04.029
53. Cheng K, Sloan A, Li X, et al. Mass spectrometry-based Shiga toxin identification: An optimized approach. *J Proteomics*. 2018;180:36–40. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.06.003
54. Silva CJ, Erickson-Beltran ML, Skinner CB, et al. Mass spectrometry-based method of detecting and distinguishing type 1 and type 2 Shiga-like toxins in human serum. *Toxins*. 2015;7(12):5236–5253. DOI: 10.3390/toxins7124875
55. Vila J, Juiz P, Salas C, et al. Identification of clinically relevant Corynebacterium spp., Arcanobacterium haemolyticum, and Rhodococcus equi by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012;50(5): 1745–1747. DOI: 10.1128/JCM.05821-11
56. Alatoom AA, Cazanave CJ, Cunningham SA, et al. Identification of non-diphtheriae corynebacterium by use of matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012;50(1):160–163. DOI: 10.1128/JCM.05889-11
57. Patel R. MALDI-TOF mass spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology. *Clin Chem*. 2013;59(2):340–342. DOI: 10.1373/clinchem.2012.183558
58. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):380–407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x
59. Oviaño M, Ingebretsen A, Steffensen AK, et al. Evaluation of the rapidBACpro® II kit for the rapid identification of microorganisms directly from blood cultures using MALDI-TOF MS. *bioRxiv*. 2021. [preprint]. DOI: 10.1101/2021.01.25.428200

ОБ АВТОРАХ

***Ольга Анатольевна Митева,** соискатель ученой степени; e-mail: letto2004@inbox.ru; ORCID: 0000-0002-3874-6954; SCOPUS: 551956853004; eLibrary SPIN: 2070-7250

Надежда Сергеевна Юдина, соискатель ученой степени; eLibrary SPIN: 1915-2194

Вадим Александрович Мясников, кандидат медицинских наук; eLibrary SPIN: 5084-2723

Александр Валентинович Степанов, доктор медицинских наук, профессор; eLibrary SPIN: 7279-7055

Сергей Викторович Чепур, доктор медицинских наук, профессор; eLibrary SPIN: 3828-6730

AUTHORS INFO

***Olga A. Miteva,** applicant for an academic degree; e-mail: letto2004@inbox.ru; ORCID: 0000-0002-3874-6954; SCOPUS: 551956853004; eLibrary SPIN: 2070-7250

Nadezhda S. Yudina, applicant for an academic degree; eLibrary SPIN: 1915-2194

Vadim A. Myasnikov, candidate of medical sciences; eLibrary SPIN: 5084-2723

Alexander V. Stepanov, doctor of medical sciences, professor; eLibrary SPIN: 7279-7055

Sergey V. Chepur, doctor of medical sciences, professor; eLibrary SPIN: 3828-6730

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author