

Д.В.Ульшина, Е.И.Еременко, Д.А.Ковалев, А.Г.Рязанова, И.В.Кузнецова, Л.Ю.Аксенова, О.В.Семенова, О.В.Бобрышева, Ю.В.Сирица, А.Н.Куличенко

ВЫЯВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ МАСС-СПЕКТРОВ БЕЛКОВЫХ ЭКСТРАКТОВ СПОРОВОЙ И ВЕГЕТАТИВНОЙ ФОРМ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ МЕТОДОМ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Ставропольский противочумный институт

Цель. Исследование особенностей белковых профилей споровой и вегетативной форм сибиреязвенного микроба методом MALDI-TOF MS с использованием ресурсов программы Mass-Up и комплекса пакетов для статистического программного обеспечения с открытым исходным кодом R. *Материалы и методы.* Споровая и вегетативная формы 32 штаммов *B. anthracis* из коллекции микроорганизмов Ставропольского противочумного института, в том числе 8 штаммов, выделенных при вспышке сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Белковое профилирование проводили на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex «Bruker Daltonics». *Результаты.* Используемый альтернативный биоинформационно-статистический подход для анализа MALDI-TOF масс-спектров возбудителя сибирской язвы позволил дифференцировать споровую и вегетативную формы микроба на основании выявления соответствующих групп биомаркеров. *Заключение.* Проведено сравнение вегетативных и споровых клеток типичных и атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы на основании данных MALDI-TOF MS. Экспериментально подтверждено, что белковые профили экстрактов культур сибиреязвенного микроба споровой и вегетативной форм существенно отличаются и это различие можно использовать для поиска потенциальных маркеров каждой из форм.

Журн. микробиол., 2018, № 6, С. 66—72

Ключевые слова: возбудитель сибирской язвы, масс-спектрометрия, белковое профилирование

D.V.Ulshina, E.I.Eremenko, D.A.Kovalev, A.G.Ryazanova, I.V.Kuznetsova, L.Yu.Aksenova, O.V.Semenova, O.V.Bobrysheva, Yu.V.Siritsa, A.N.Kulichenko

STUDY OF THE MASS-SPECTORS' FEATURES OF SPORES AND VEGETATIVE FORMS OF *BACILLUS ANTHRACIS* BY THE METHOD OF TIME OF FLIGHT MASS-SPECTROMETRY

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. Investigation of the features of the protein profiles of the spore and vegetative form of the anthrax microbe by the MALDI-TOF MS method using the resources of the Mass-Up program and the package for the statistical software with open source code R. *Materials and methods.* Spores and vegetative forms of 32 strains of *B. anthracis* from the collection of microorganisms of the Stavropol Research Institute for Plague Control, including 8 strains isolated from an outbreak of anthrax in Yamal in 2016. Protein profiling was carried out on the Microflex MALDI-TOF mass spectrometer «Bruker Daltonics». *Results.* The alternative bioinformational-statistical approach used to analyze the MALDI-TOF mass spectra of the causative agent of anthrax made it possible to differentiate the spores and vegetative forms of the microbe based on the identification of the corresponding groups of biomarkers. *Conclusion.* A comparison of vegetative and spore cells of typical and atypical strains of anthrax causative agent on the basis of MALDI-TOF MS data was made. It has been experimentally confirmed that the protein profiles of cultures of *Bacillus anthracis* of the spore and vegetative form differ significantly, and this difference can be used to search for potential markers of each of the forms.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 6, P. 66—72

Key words: *Bacillus anthracis*, mass spectrometry, protein profiling

ВВЕДЕНИЕ

Сибирская язва представляет проблему общественного здравоохранения и ветеринарии в силу малой предсказуемости нередких эпизоотических проявлений, часто сопровождающихся заболеваемостью людей. Возбудитель инфекции — *Bacillus anthracis* принадлежит к числу агентов биологического оружия и терроризма, высокий поража-

ющий потенциал которого хорошо известен [7, 9]. Поэтому быстрая и точная индикация и идентификация возбудителя сибирской язвы важна и требует совершенствования методов лабораторного исследования. Молекулярные методы с использованием специфичных генетических маркеров для идентификации микроорганизмов получили широкое распространение, с ними конкурирует по скорости и чувствительности масс-спектрометрический анализ биополимеров, в частности, белков с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с лазерно-активируемой матричной десорбцией-ионизацией (MALDI-TOF MS). В настоящее время разработаны приборы, программное обеспечение и базы данных масс-спектров, позволяющие за короткое время с высокой точностью идентифицировать возбудители многих бактериальных инфекций, однако их использование для идентификации особо опасных патогенов затруднено отсутствием в открытом доступе баз данных масс-спектров этих микробов. Другим ограничением этого подхода является необходимость получения чистой вегетативной культуры возбудителя, что требует от одних до нескольких суток в зависимости от вида микроба. В клиническом материале возбудитель сибирской язвы, как правило, присутствует в форме вегетативных клеток, в материале из объектов окружающей среды, например, в почве — в споровой форме. Поскольку в разных фазах роста экспрессируются разные белки, качественные и количественные характеристики масс-спектров в большой степени зависят от того, в какой форме исследуется возбудитель. Тем не менее, по литературным данным, примерно в 50% препаратов вегетативных клеток бацилл группы *Bacillus cereus*, в которую входит *B. anthracis*, обнаруживаются интенсивные пики с массой, соответствующей малым кислоторастворимым белкам спор (SASP), среди которых пик с m/z 6679 специфичен для возбудителя сибирской язвы [2, 8]. По данным ряда авторов специфичны для *B. anthracis* пики в спектрах споровых препаратов отличаются [3, 4, 6]. Различия могут быть связаны с существованием атипичных штаммов, отличающихся по ряду фенотипических и генетических свойств, к которым можно отнести аттенуированные вакцинные штаммы [1].

Оценка масс-спектров с целью идентификации бактерий и грибов методом MALDI-TOF MS проводится с использованием коммерческих платформ BioType[®] (Bruker Daltonics), SARAMIS Vitek-MS (Biomerieux) и Andromas (Andromas SAS). Кроме отсутствия в этих базах данных спектров возбудителей особо опасных инфекций (ООИ), еще одним недостатком этого подхода является недостаточная точность дифференциации близкородственных микроорганизмов [11]. Поэтому предпринимаются усилия, направленные на создание дополнительной библиотеки спектров на основе более совершенного статистического анализа с целью достижения однозначной дискриминации *B. anthracis* от близкородственных бацилл [10]. Описан и другой, достаточно сложный, подход для идентификации возбудителя сибирской язвы методом MALDI-TOF MS, не связанный с применением коммерческих информационных платформ, в котором анализ базы данных проводили на основе модели искусственных нейронных сетей [8].

Таким образом, существует потребность в разработке и применении для идентификации *B. anthracis* доступного и эффективного информационного алгоритма обработки данных MALDI-TOF MS. В связи с неоднозначностью сведений о характеристиках масс-спектров вегетативных и споровых клеток сибиреязвенного микроба представляется также актуальным сравнение таковых у набора типичных и атипичных штаммов.

Цель работы — выявление особенностей белковых профилей споровой и вегетативной форм сибиреязвенного микроба методом MALDI-TOF MS с использованием ресурсов программы Mass-Up и комплекса пакетов для статистического программного обеспечения с открытым исходным кодом R.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали споровую и вегетативную формы 32 штаммов *B. anthracis* из коллекции микроорганизмов Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора, в том числе 8 штаммов, выделенных при вспышке сибирской язвы на Ямале в 2016 году (табл.).

Штаммы *Bacillus anthracis*, использованные в работе

Штамм	Дата выделения	Место выделения	canSNP-генотип	Плазмиды
Вирулентные штаммы				
13/39	24.12.1962	Дагестан	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
28/83	15.06.1967	Дагестан	A.Br.Aust94	pXO1 pXO2
30/86	11.08.1967	Дагестан	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
47/28	29.07.1968	Ингушетия	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
48/29	13.08.1968	Ингушетия	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
54/35	23.08.1968	Ингушетия	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
57/38	30.08.1968	Чеченская Р.	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
62/111	17.05.1968	Дагестан	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
71/171	28.01.1969	Сев. Осетия-Алания	A.Br.Aust94	pXO1 pXO2
73/42	20.09.1968	Сев. Осетия-Алания	A.Br.Aust94	pXO1 pXO2
527/141	02.09.1981	Калмыкия	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
611/76_91	13.09.1983	Сев. Осетия-Алания	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
619/42	29.07.1983	Чеченская Р.	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
759/79	16.09.1985	Волгоградская обл.	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
863/217	29.08.1987	Чеченская Р.	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
1020/11	25.07.1992	Карачаево-Черкессия	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
1258	27.09.2004	Ставропольский кр.	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
1265	27.10.2006	Сев. Осетия-Алания	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
1273	15.05.2009	Волгоградская обл.	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
1322	13.08.2013	Ставропольский кр.	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
1337/5875	13.08.2013	Ямало-ненецкий АО	V.Br.001/002	pXO1 pXO2
1339/24	27.07.2016	Ямало-ненецкий АО	V.Br.001/002	pXO1 pXO2
1340/26	27.07.2016	Ямало-ненецкий АО	V.Br.001/002	pXO1 pXO2
1342/12	29.07.2016	Ямало-ненецкий АО	V.Br.001/002	pXO1 pXO2
1345/27	06.07.2016	Ямало-ненецкий АО	V.Br.001/002	pXO1 pXO2
1346/29	08.07.2016	Ямало-ненецкий АО	V.Br.001/002	pXO1 pXO2
Вакцинные штаммы				
71/12	1883	Харьковский университет (Л.С. Ценковский)	A.Br.008/009	pXO1 pXO2
СТИ-1	1940	Санитарно-технический институт (Н.Н. Гинсбург)	A.Br.008/009	pXO1
СТИ-ПР	1985	НИИ противочумный Кавказа и Закавказья (Н.П. Буравцева и др.)	A.Br.008/009	pXO1
Вирулентные штаммы				
Sterne 34F2	1935	Onderstepoort Vet. Res. Inst., Pretoria (Max Sterne) Южно-Афр. Союз	A.Br.001/002	pXO1
55-ВНИИВиМ	1985	ВНИИВиМ (И.А. Бакулов)	A.Br.008/009	pXO1
Ихтиман	1967	Болгария (Slavtchev R.S.)	не определен	pXO1

Питательные среды, реактивы: сверхчистая вода для масс-спектрометрии — хроматографии (Fluka, Германия), ацетонитрил, степень чистоты «для ВЭЖХ-МС» (Sigma-Aldrich, США), трифторуксусная кислота, > 99 % (Sigma-Aldrich, США), α -циано-4-гидроксикоричная кислота, степень чистоты «для MALDI-MS» (Bruker Daltonics, Германия), Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (Becton Dickinson, США), агар порошок микробиологический, бактериальный тест-стандарт МВТ для внутренней калибровки масс-спектрометра (Bruker Daltonics, Германия).

Вся работа с исследуемым материалом, подозрительным на зараженность микроорганизмами I-II групп патогенности, проводилась в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Для исследования методом MALDI-TOF MS использовали 18 — 24 ч культуры *B. anthracis*, выращенные из отдельной колонии на пластинках BHIA при 37 °С. Для исследования спор *B. anthracis* использовали отмытые в дистиллированной

воде взвеси, полученные после 7-10 суток культивирования возбудителя на агаре Гладстона-Филдса. Суспендировали 1 микробиологическую петлю (№ 1) чистой вегетативной культуры в 300 — 500 мкл дистиллированной воды. При обеззараживании культур возбудителя сибирской язвы 20 мкл полученной взвеси вегетативной культуры или взвеси отмытых спор суспендировали в 80 мкл ТФК, выдерживая при комнатной температуре в течение 5 минут, затем центрифугировали в течение 30 мин при 13000 об/мин. Полученный супернатант переносили в ультрамикроцентрифужный PVDF фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, центрифугировали в микроцентрифуге при 13000 об./мин в течение 20 мин.

Фильтрат из нижней части центрифужного ультрафильтра переносили в микропробирку типа Эппендорф и использовали для исследования. Верхнюю и нижнюю составляющие части центрифужного ультрафильтра помещали в дезраствор в соответствии с СП 1.3.3118-13. С полученным фильтратом работали как с обеззараженным материалом.

Обеззараженный образец в количестве 1 мкл помещали на пластину-мишень MS 96 spot Micro SCOUT Plate (Bruker Daltonics, Германия) и высушивали на воздухе. Затем на высушенный образец наносили 1 мкл матрицы, состоящей из α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в растворе, содержащем 500 мкл ацетонитрила, 475 мкл ультрачистой воды и 25 мкл трифторуксусной кислоты, и сушили на воздухе. Таким образом, достигалась гомогенность полученных образцов, что обеспечило высокую воспроизводимость (> 95%) при получении масс-спектров в автоматическом режиме.

Масс-спектры получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия) при следующих параметрах: частота лазера 60 Гц, интенсивность лазера 10—50%, время задержки экстракции 110 нс P1E, напряжение первого источника ионов 19,4 kV, второго — 17,3 kV, напряжение фокусирующей линзы 8 kV, напряжение линейного детектора 2,500 kV, диапазон масс 2000—20000 Da. Внутреннюю калибровку ранее указанного диапазона проводили с использованием точных значений масс бактериального тест-стандарта MBT (Bruker Daltonics, Германия). Каждый масс-спектр генерировали из 500 лазерных выстрелов (10×50 лазерных выстрелов с разных позиций каждой капли мишени). Для управления масс-спектрометром, включая установку режимов работы и регистрации масс-спектров, использовали программный пакет flexControl v3.3.64 (Bruker Daltonics, Германия), для предварительной оценки интенсивности и разрешения пиков в спектре — flexAnalysis v 3.3.65. Формирование промежуточных таблиц проводили с использованием программных ресурсов пакета Microsoft Office 2010. Визуализацию и анализ полученных масс-спектров осуществляли с применением прикладных пакетов в статистическом программном обеспечении R (<https://cran.r-project.org/>) и Mass-Up (<http://sing.ei.uvigo.es>).

В качестве маркеров использовали сигналы, p-value которых было <0,05 (Randomization Test of Independence) на основании 10 000 повторений. Различия между выборками считали достоверными при p<0,05. Разделительную способность модели оценивали перекрестной валидацией.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе настоящего исследования были получены и исследованы масс-спектры 32 штаммов *B. anthracis*.

Необработанные масс-спектры для каждого анализируемого бактериального образца в формате исходного расширения преобразовывали, используя пакет для анализа данных спектрометрии MALDIquant, реализованный в среде R, представляющий альтернативу для интерпретации данных MALDI-TOF MS [5]. По итогам преобразований была построена бинарная матрица, учитывающая значение m/Z и интенсивность для каждого сигнала, на основании которой была проведена иерархическая кластеризация штаммов сибирезвездного микроба для двух форм.

Используемое ПО позволяет обнаруживать потенциальные биомаркеры, разрабатывать модели для автоматической классификации исследуемых культур на основании выявления различий в соответствующих спектрах.

Предварительная обработка масс-спектров заключалась в преобразовании интенсивности a.i. (square root method), сглаживании (метод Savitzky-Golay), коррекции базовой линии (метод SNIP), нормализации интенсивности пика (total ion current, TIC), при отношении сигнал-шум равное 3. Выравнивание значений m/Z сигналов проводили на основании пяти реплик каждого образца (intra-sample). В качестве дополнительного этапа фильтрации значимых сигналов от ложных все реплики каждого образца были слиты в единый «суммарный» спектр. Таким образом, из 320 спектров было получено по 32 преобразованных спектра, по одному на каждый образец для споровой, а также для вегетативной формы соответственно.

Воспроизводимость масс-профилей отдельных образцов культур *V. anthracis* была подтверждена серией повторных измерений. При проведении масс-спектрометрического анализа проб, хранившихся до 3 сут при температуре минут 18 °С, изменений основных характеристик сигналов масс-спектров не выявлено.

В данном исследовании мы экспериментально подтвердили предположение о том, что белковые профили экстрактов культур сибирезавенного микроба споровой и вегетативной формы существенно отличаются, и это различие можно использовать для поиска потенциальных маркеров каждой из форм.

Визуализация данных, основанная на использовании метода главных компонент (PCA, principal component analysis) (рис. 1) позволяет группировать анализируемые нами объекты с учетом следующих исходных признаков: отсутствие/присутствие, m/Z и интенсивность сигнала (3-мерное пространство первых трёх главных компонент). Этот метод является одновременно методом понижения размерности (количества измерений) данных. Построенные плоскости проектирования — трехмерный экран нами были расположены таким образом, чтобы обеспечить картину данных с наименьшими искажениями.

В результате применения метода главных компонент к данным MALDI-TOF MS была сформирована таблица, где каждый штамм возбудителя был охарактеризован по трем важным признакам, называемых главными компонентами. Полученная таблица преобразована в график, на котором каждый штамм *V. anthracis* представлен точкой, а вегетативная форма возбудителя (характеризующаяся близкими значениями главных компонент) расположена относительно споровой компактно и дискретно.

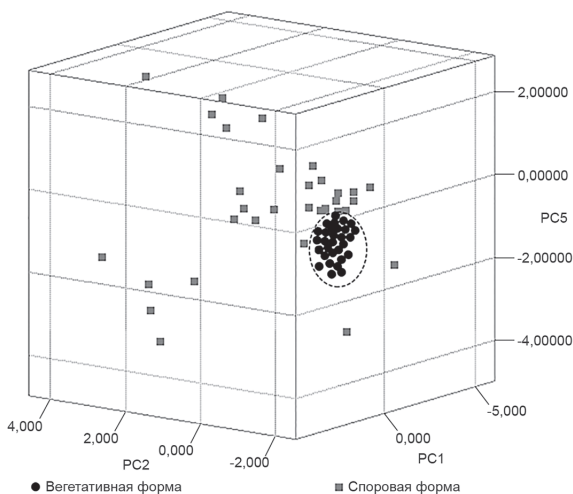


Рис. 1. Диаграмма распределения штаммов *V. anthracis* в вегетативной (маркеры внутри эллипса) и споровой формах по результатам анализа MS профилей методом PCA.

Использование 3D-моделирования средствами PCA для пространственной визуализации представителей *V. anthracis* на основании сходства/различия их белковых профилей имеет важное преимущество — распределение изучаемых объектов в трехмерном пространстве с возможностью динамического изменения угла обзора. В построенной системе координат между представителями штаммов возбудителя в вегетативной форме почти отсутствует дистанция, что привело к их объединению в «облако», напротив, для представителей споровой формы можно отметить рассредоточенность в пространстве. Полученное распределение в полной мере согласуется с результатом анализа с использованием интегрированных инструментов программного

пакета MALDI Biotурer и обусловлено, главным образом, существенно более высоким уровнем представительности и вариабельности белковых профилей кислотных экстрактов споровых форм *V. anthracis* по сравнению с вегетативными.

В ходе анализа полученных результатов было показано, что к общим фрагментам для вегетативной и споровой формы можно отнести 6 пиков ($m/Z \pm 5$ Da): 2229, 2285, 3348, 3590, 4033, 6444. Для вегетативной формы сибирезвенного микроба были определены следующие сигналы ($m/Z \pm 5$ Da): 2011, 2482, 2600, 2728, 2859, 3149, 3188, 3263, 3320, 3433, 3557, 3652, 3691, 3901, 4210, 4623, 4759, 4829, 4884, 5204, 5460, 5634, 6278, 6378, 6524, 6869, 7116, 7384, 7802, 8088, 9227, 9659, 9755. В качестве аналитически значимых сигналов споровой формы *V. anthracis* выступали следующие фрагменты ($m/Z \pm 5$ Da): 2024, 2131, 2354, **2503** [6], **2528** [4], 3116, 3376, 3679, 4055, 4086, 4397, 4791, **6698** [6], 6726, 6897, 7479, 9829.

Максимальное количество пиков отмечено при масс-спектрометрии вегетативных клеток — всего 39, из них характерных только для этой формы *V. anthracis* было 33. Анализ масс-спектров экстрактов спор позволил обнаружить 23 пика, из которых спороспецифичных было 17. Общие для вегетативной и споровой формы пики составляли небольшую долю: 6 от общего количества — 56 пиков.

По результатам масс-спектрометрии вегетативных и споровых форм штаммов возбудителя сибирской язвы проведен кластерный анализ (рис.2). В дендрограммах отчетливо видно разделение всех штаммов на две главные группы — А и В. Группы

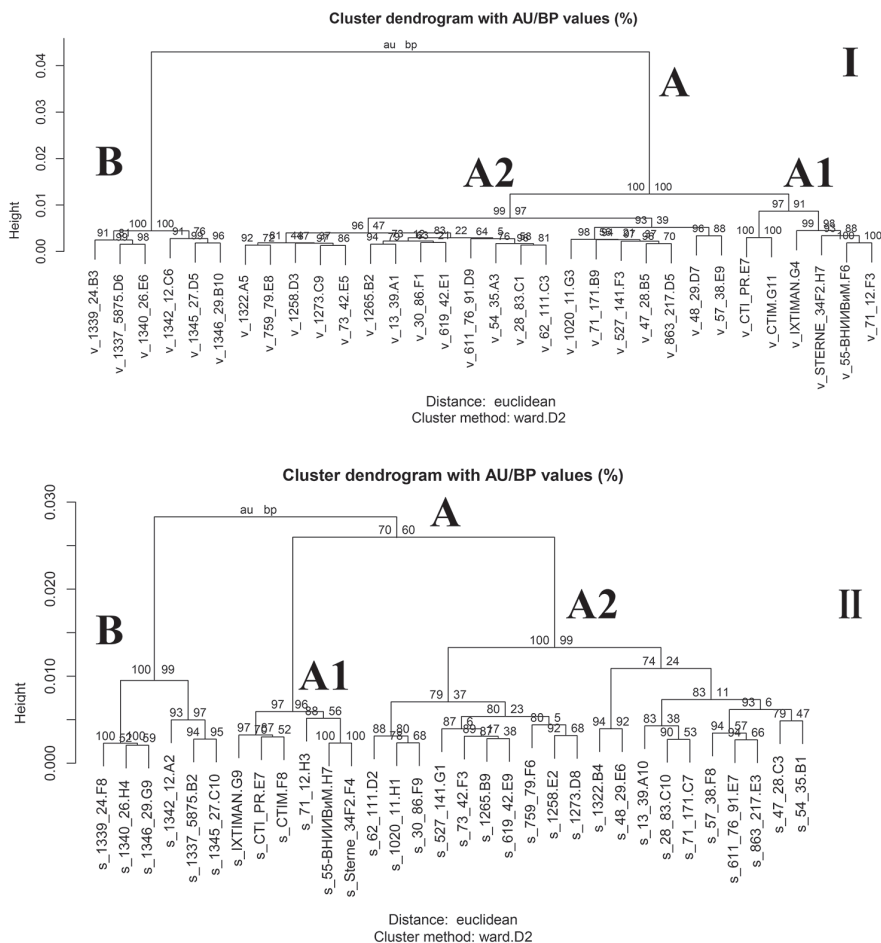


Рис. 2. Кластерный анализ результатов масс-спектрометрии вегетативных и споровых форм *Vacillus anthracis*. I — вегетативная форма, II — споровая форма.

В составляют выделенные от людей, оленей и из материала из окружающей среды в 2016 году на Ямале штаммы. Независимо от формы, это разделение соответствует наблюдаемому при филогенетическом анализе на основании SNP и MLVA генотипирования выделенных на территории Российской Федерации штаммов *B. anthracis*. Кроме того, примечательно выделение всех вакцинных штаммов в отдельную подгруппу A1 в составе главной группы А.

Таким образом, успешно применен новый биоинформационно-статистический подход для анализа MALDI-TOF масс-спектров возбудителя сибирской язвы, который позволил дифференцировать спорую и вегетативную формы микроба на основании выявления соответствующих групп биомаркеров. Кроме того, он обеспечивает достаточную внутривидовую дискриминирующую способность, подтверждаемую кластеризацией штаммов, соответствующей достигаемой при филогенетической оценке родства на основе генетического типирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Цыганкова Е.А., Цыганкова О.И., Куличенко А.Н. Генотипические особенности штаммов *Bacillus anthracis* с разным проявлением признаков, ассоциированных с патогенностью. Проблемы особо опасных инфекций. 2010, 104:53-56.
2. Castanha E.R., Fox A., Fox K.F. Rapid discrimination of *Bacillus anthracis* from other members of the *B. cereus* group by mass and sequence of “intact” small acid soluble proteins (SASPs) using mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*. 2006, 67(2):230-240.
3. Dybwad M., van der Laaken A.L., Blatny J.M. et al. Rapid Identification of *Bacillus anthracis* Spores in Suspicious Powder Samples by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79(17): 5372-5383.
4. Elhanany E., Barak R., Fisher M. et al. Detection of specific *Bacillus anthracis* spore biomarkers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001, 15(22):2210-2216.
5. Gibb S., Strimmer K. Mass spectrometry analysis using MALDIquant. *Statistical Analysis of Proteomics, Metabolomics, and Lipidomics Data Using Mass Spectrometry*. Springer. Cham. 2017:101-124.
6. Jeong Y.S., Lee J., Kim S.J. Discrimination of *Bacillus anthracis* Spores by Direct in-situ Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2013, 34(9):2635-2639.
7. Jernigan D.B., Raghunathan P.L., Bell B.P. et al. Investigation of Bioterrorism-Related Anthrax, United States, 2001: Epidemiologic Finding, *Emerging Infectious Diseases*. 2002, 8(10):1019-1028.
8. Lasch P., Beyer W., Nattermann H. et al. Identification of *Bacillus anthracis* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009: 7229-7242.
9. Meselson M., Guillemin J., Hugh-Jones M. et al. The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science*. 1994, 266(5188):1202-1208.
10. Pauker V.I., Thoma B.R., Grass G. et al. Improved discrimination of *Bacillus anthracis* from Closely Related Species in the *Bacillus cereus sensulato* Group based on MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2018, doi: 10.1128/JCM.01900-17.
11. Theel E. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates. *Communique Mayo Medical Laboratories*. January 2013.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Т.И.Твердохлебова¹, О.С.Думбадзе¹, Л.А.Ермакова¹, Е.В.Ковалев², А.В.Алешукина¹, С.А.Нагорный¹, К.Х.Болатчиев³, И.В.Хуторянина¹

СИТУАЦИЯ ПО ЛАРВАЛЬНЫМ ГЕЛЬМИНТОЗАМ НА ЮГЕ РОССИИ И ОПТИМИЗАЦИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА НИМИ

¹Ростовский-на-Дону НИИ микробиологии и паразитологии; ²Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, Ростов-на-Дону; ³Управление Роспотребнадзора по Карачаево-Черкесской Республике, Черкесск

В статье представлены результаты деятельности Ростовского научно-исследовательского института микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора, направленной на изучение ситуации и оптимизацию эпидемиологического надзора за ларвальными гельминтозами, актуальными для