

А.А.Будченко, И.Ю.Мазурова, В.И.Илюхин

## ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА КЛЕТОЧНЫХ АНТИГЕНОВ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОБЛОТТИНГА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация

Проведен сравнительный анализ иммуноэлектрофореграмм клеточных антигенов – *B. pseudomallei* C-141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416 после иммуноблоттинга с иммунными кроличьими сыворотками, полученными к живым клеткам авирулентного штамма *B. pseudomallei* 107, клеточным и внеклеточным антигенам *B. pseudomallei* 107, *B. pseudomallei* C-141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416. Визуальный анализ позволил на иммуноэлектрофореграмме клеточных антигенов *B. mallei* 10230, полученной в иммуноблоттинге с сывороткой к клеточным антигенам *B. mallei* 10230, выявить фракции с молекулярными массами 18,4 и 35 kDa, отсутствующие на иммуноэлектрофореграмме *B. pseudomallei* C-141 после иммуноблоттинга с этой же сывороткой, что позволяет дифференцировать патогенные буркхольдерии. В то же время использование в иммуноблоттинге гетерологичных иммунных сывороток повышает дискриминирующую способность сравнительного анализа иммуноэлектрофореграмм клеточных антигенов в целях дифференциации патогенных буркхольдерий. Уровень воспроизводимости иммуноэлектрофореграмм позволяет использовать коэффициенты их сходства для сравнительного анализа с применением компьютерных программ.

*Ключевые слова:* анализ, иммуноблоттинг, клеточные и внеклеточные антигены, сыворотка, *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*.

A.A.Budchenko, I.Yu.Mazurova, V.I.Ilyukhin

## Studies of the Composition of the Cell Antigen Preparations Obtained from Pathogenic Burkholderia, Using Immunoblotting

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Carried out has been comparative analysis of the cell antigen immune-electrophoregrammes of *B. pseudomallei* C-141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, and *B. cepacia* 25416 after immunoblotting with immune rabbit sera to living cells of avirulent *B. pseudomallei* 107, cellullar and extracellular antigens of *B. pseudomallei* 107, *B. pseudomallei* C-141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, and *B. cepacia* 25416. Visual investigation has revealed the presence of fractions with molar mass of 18.4 and 35 kDa in *B. mallei* 10230 cell antigens' electrophoregramme obtained by means of immunoblotting with serum to *B. mallei* 10230 cell antigens, as distinct from *B. pseudomallei* C-141 electrophoregramme with the same serum. This makes it possible to distinguish the pathogenic Burkholderia. At the same time utilization of heterologous immune sera enhances discriminating capacity of the comparative assay. The level of reproducibility of immune-electrophoregrammes allows for the deployment of the similarity coefficient for computer-based comparative analysis.

*Key words:* analysis, immunoblotting, cellular and extracellular antigens, serum, *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*.

Мелиоидоз – инфекция людей и животных, эндемичная в районах Юго-Восточной Азии и Северной Австралии. Быстрая и точная диагностика инфекции имеет большое значение для своевременного адекватного лечения. Несмотря на то, что «золотым стандартом» постановки диагноза мелиоидоза является выделение от больного культуры возбудителя, в эндемичных этому заболеванию регионах для ускоренной диагностики чаще всего применяют РНГА и ТИФА [11, 12]. Чувствительность и специфичность этих методов значительно зависят от антигенов, используемых для сенсбилизации эритроцитов (РНГА) и пластин (ТИФА), и не всегда составляют 100 %. Поэтому активно продолжается поиск антигенов, обеспечивающих одновременно максимальные чувствительность и специфичность этих методов [10]. Иммуноблоттинг, являясь разновидностью гетерогенного иммунного анализа, представляет собой

эффективный метод выявления иммуногенных фракций в антигенных комплексах изучаемых микроорганизмов. Применяли иммуноблоттинг при изучении микроорганизмов, относящихся к группе особо опасных, в том числе патогенных буркхольдерий. Так, в 1993 г. N.Anuntagool *et al.* получили и проанализировали иммуноэлектрофореграммы после иммуноблоттинга с сывороткой больного мелиоидозом клеточных антигенов *B. pseudomallei*, *B. cepacia*, некоторых псевдомонад на наличие перекрестных антигенов [6]. J.V.Katz. *et al.* предложили ввести иммуноблоттинг как дополнительный метод для выявления антител к антигенам *B. mallei* у лошадей в требования OIE (The Office of International Des Epizooties) по оформлению таможенных документов на их перевозку за пределы страны-хозяина [8]. Применялся иммуноблоттинг в качестве метода полифазной таксономии при дифференциации видов бруцелл [5].

Целью работы был поиск различий в составах антигенных фракций на иммуноэлектрофореграммах клеточных антигенов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, полученных методом иммуноблоттинга с иммунными сыворотками к живым клеткам, клеточным и экстрацеллюлярным антигенам, которые можно использовать для дифференциации патогенных видов буркхольдерий.

### Материалы и методы

Для анализа взяты типичные штаммы: вирулентный – *B. pseudomallei* C-141 и авирулентный – *B. pseudomallei* 107, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416 из коллекционного центра Волгоградского противочумного института. Получены иммунные кроличьи сыворотки к живым клеткам *B. pseudomallei* 107, клеточным и экстрацеллюлярным антигенам (ЭЦА) штаммов *B. pseudomallei* 107, *B. pseudomallei* C141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416. Бактерии *B. pseudomallei* 107 для иммунизации выращивали на питательном агаре *Pseudomonas Agar F «Difco»* (США) (F-агар) в течение 18 ч при 37 °С. Иммунизировали кроликов дозой – 10<sup>9</sup> м.к. в 1 мл 0,15 М раствора NaCl (рН 7,2) по схеме: первое введение и через 7 сут второе – подкожно, третье – через 14 сут внутривенно. Кровь брали через 7 сут после последнего введения (титры сыворотки в реакции иммунодиффузии составили 1:32). Клеточные антигены получали из бактериальной массы штаммов *B. pseudomallei* 107, *B. pseudomallei* C141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416, выращенной на F-агаре в матрицах в течение 18 ч при 37 °С. Бактериальную массу смывали 0,9 % раствором натрия хлорида и стерилизовали охлажденным до –40 °С ацетоном в соотношении объемов 1:3. Клеточные антигены (супернатант) получали после ультразвуковой обработки суспензии бактериальной массы и центрифугирования (10000 г, 25 мин). Хранили антигены при –40 °С. Для получения ЭЦА бактериальную массу, росшую в течение 18 ч на агаре, покрытом целлофаном, смывали 0,9 % раствором натрия хлорида, центрифугировали (15000 г, 25 мин). Супернатант фильтровали (размер пор фильтра 0,45 мкм). ЭЦА стерилизовали и осаждали из суспензии охлажденным ацетоном (–40 °С) в соотношении объемов 1:3. Концентрацию протеина в пробах измеряли методом М.М.Бредфорда [7]. Для получения иммунных сывороток к клеточным антигенам и ЭЦА кроликов иммунизировали смесью антигенов (1 мг/мл) с неполным адьювантом Фрейнда («Calbiochem», США) в соотношении 1:1 вдоль позвоночника в 10 точек четырехкратно с интервалом в 7 дней. Кровь отбирали при титрах сывороток в реакции иммунодиффузии 1:32. Электрофорез в ПААГ с додецилсульфатом натрия (ДСН) проводили в вертикальных пластинах (14×16×0,1 см) по U.K.Laemmli [9]. Одну часть геля после электрофореза окрашивали раствором Кумасси G-250, вторую – использовали в блоттинге (размер пор мембраны – 0,45 мкм, время

переноса – 2 ч) [13]. Фракции антигенов выявляли иммуноферментным методом, используя полученные сыворотки и меченные пероксидазой антитела против кроличьих иммуноглобулинов («Медгамал», Россия). В качестве субстрата применяли тетраметилбензидин. Воспроизводимость иммуноэлектрофореграмм определяли, получая их не менее трех раз для каждой серии сыворотки и вычисляя коэффициент сходства Дайса [1].

### Результаты и обсуждение

Получены электрофореграммы суммарных клеточных белков 4 видов буркхольдерий в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ с ДСН) с последующим выявлением протеинов окраской Кумасси G-250 и иммуноферментным методом (иммуноблоттинг) с иммунными сыворотками к живым клеткам и клеточным антигенам *B. pseudomallei* 107 (рис. 1). На электрофореграммах суммарных антигенов буркхольдерий, окрашенных Кумасси G-250, имеются две мажорные фракции (33,6 и 64 kDa), которые, как ранее нами показано, присутствуют в составе электрофореграмм суммарных клеточных белков штаммов буркхольдерий, имеющих в коллекции Волгоградского противочумного института [2]. Также нами было доказано, что различия в составе суммарных клеточных белков буркхольдерий позволяют, используя специальные компьютерные программы, проводить их видовую дифференциацию [2]. Визуальный сравнительный анализ полученных иммуноэлектрофореграмм с сывороткой к живым клеткам (рис. 1, Б) и клеточным антигенам (рис. 1, В) *B. pseudomallei* 107 выявил различия их как в составе мажорных (крупных) фракций, так и всего набора антигенных фракций. Так, на иммуно-

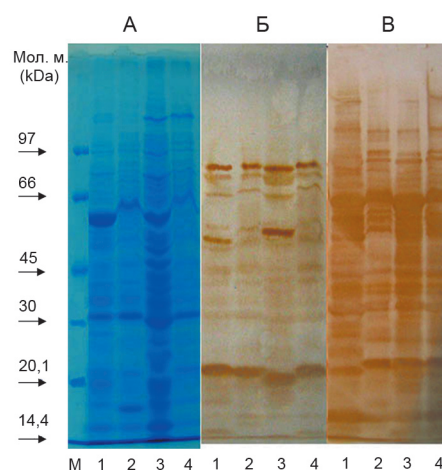


Рис. 1. Электрофореграммы и иммуноэлектрофореграммы клеточных антигенов буркхольдерий:

А – электрофореграммы после электрофореза в ПААГ с ДСН, окрашенные Кумасси G-250; Б – иммуноэлектрофореграммы блоттинга с иммунной сывороткой к живым клеткам *B. pseudomallei* 107; В – иммуноэлектрофореграммы блоттинга с иммунной сывороткой к клеточным антигенам *B. pseudomallei* 107. М – трек с маркерными белками. Обозначения трек с антигенами штаммов: 1 – *B. pseudomallei* C-141; 2 – *B. mallei* 10230; 3 – *B. cepacia* 25416; 4 – *B. thailandensis* 264

электрофореграммах анализируемых штаммов, после иммуноблоттинга с сывороткой к живым клеткам *B. pseudomallei* 107, выявлены мажорные фракции с молекулярной массой 20,1 и 88 kDa, которые на иммуноэлектрофореграммах после блоттинга с сывороткой к клеточным антигенам относятся к фракциям с малым количеством антигена. Можно сделать вывод, что при введении живых бактерий в организм кролика антитела образуются в основном к эпитопам антигенов, расположенным на поверхности клеток. При иммунизации же животного клеточными антигенами часто сохраняется зависимость: крупная фракция после окраски Кумасси G-250 – крупная фракция на иммуноэлектрофореграмме (пример – антигенная фракция молекулярной массой 60 kDa на рис. 1, А, В). Представляется перспективным препаративное выделение антигенных фракций с молекулярной массой 20,1 и 88 kDa и использование их в получении группоспецифического препарата для идентификации буркхольдерий. Ранее сообщалось о применении фракции 20,1 kDa для сенсibilизации пластин в ТИФА при диагностике мелиоидоза [4].

Получены иммуноэлектрофореграммы клеточных антигенов 4 штаммов буркхольдерий в иммуноблоттинге с иммунными кроличьими сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА *B. pseudomallei* C-141 и *B. mallei* 10230 (рис. 2). В результате визуального анализа представленных иммуноэлектрофореграмм установлено, что спектры антигенных фракций штаммов *B. pseudomallei* C-141, *B. mallei* 10230 и *B. thailandensis* 264, выявленные в иммуноблоттинге с сывороткой к клеточным антигенам *B. pseudomallei* C-141, отличались незначительно (рис. 2, А). Это показывает, что существует большое количество идентичных эпитопов на антигенных комплексах, взятых для иммунизации [3]. Анализ состава мажор-

ных фракций выявил в составе спектра антигенов *B. cepacia* 25416 (рис. 2, А, трек 3) антигенную фракцию с молекулярной массой 23 kDa, отсутствующую в составе спектров антигенных фракций трех других штаммов. Эти различия в составах антигенных фракций при достаточной воспроизводимости иммуноэлектрофореграмм делают возможным анализ их сходства с применением компьютерных программ. Такого же уровня были различия спектров клеточных антигенов анализируемых штаммов при использовании в иммуноблоттинге сыворотки к ЭЦА *B. pseudomallei* C-141 (рис. 2, Б). Иммуноэлектрофореграммы клеточных антигенов этих же штаммов, выявленных в иммуноблоттинге с сывороткой к клеточным антигенам *B. mallei* 10230, имели большие отличия, чем выявлялись в предыдущем случае. Так, на иммуноэлектрофореграмме *B. mallei* 10230 присутствовали мажорные фракции с молекулярной массой 18,4 и 35 kDa, отсутствующие или имеющие следовые количества на иммуноэлектрофореграммах остальных трех штаммов. Использование этих различий позволяет дифференцировать близкородственные *B. mallei* 10230 и *B. pseudomallei* C-141 (рис. 2, В, трек 2). В то же время составы спектров *B. pseudomallei* C-141 и *B. thailandensis* 264 очень близки в диапазоне 14,4–30 kDa и различались незначительно в зоне 30–66 kDa (рис. 2, В, треки 1 и 4).

Визуальный анализ клеточных антигенов буркхольдерий после иммуноблоттинга с сывороткой к ЭЦА *B. mallei* 10230 также выявил высокое сходство спектров антигенных фракций *B. pseudomallei* C-141 и *B. thailandensis* 264 (рис. 2, Г, треки 1 и 4), что коррелирует с данными о близости их фенотипов [4]. Однако спектры *B. pseudomallei* C-141 и *B. mallei* 10230, обладая высоким сходством, имеют различия в низкомолекулярной области трека. Так, в составе спектра *B. mallei* 10230 присутствует мажорная фракция 15 kDa, практически отсутствующая в спектре *B. pseudomallei* C-141 (рис. 2, Г, треки 1 и 2). Состав антигенных фракций *B. cepacia* имел большие отличия от составов фракций штаммов «группы *pseudomallei*» (рис. 2, В).

Иммуноэлектрофореграммы патогенных буркхольдерий получены в иммуноблоттинге с гетерологичными для патогенных видов иммунными сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА *B. cepacia* 25416 и *B. thailandensis* 264 (рис. 3). Спектры антигенов, выявленные сывороткой к клеточным антигенам и ЭЦА *B. thailandensis* 264, различались незначительно. Также незначительны различия спектров *B. pseudomallei* C-141 и *B. mallei* 10230 при использовании сыворотки к клеточным антигенам *B. cepacia* 25416 (рис. 3, А). В то же время есть явные различия в спектрах *B. pseudomallei* C-141 и *B. mallei* 10230, выявленных сывороткой к ЭЦА *B. cepacia* 25416 (рис. 3, Б). На треке 1 (*B. pseudomallei* C-141) присутствует антигенная фракция с молекулярной массой 19 kDa, отсутствующая на треке 2 (*B. mallei* 10230). Перспективным представляется выделение этой фракции и использование в создании препарата,

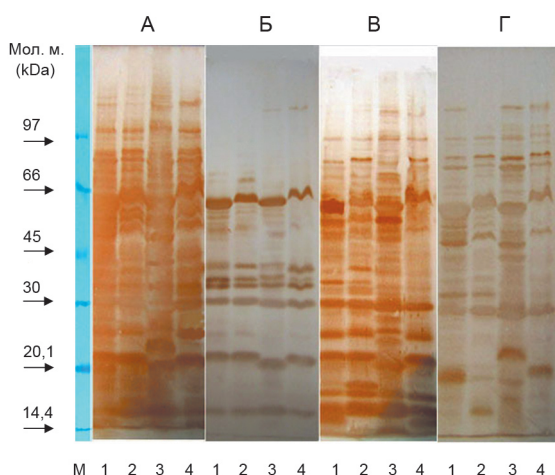


Рис. 2. Иммуноэлектрофореграммы клеточных антигенов буркхольдерий после иммуноблоттинга с иммунными сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА *B. pseudomallei* C-141 и *B. mallei* 10230:

Обозначения иммуноэлектрофореграмм: А – с сывороткой к клеточным антигенам *B. pseudomallei* C-141; Б – с сывороткой к ЭЦА *B. pseudomallei* C-141; В – с сывороткой к клеточным антигенам *B. mallei* 10230; Г – с сывороткой к ЭЦА *B. mallei* 10230. М – трек с маркерными белками. Обозначения треков с антигенами штаммов: 1 – *B. pseudomallei* C-141; 2 – *B. mallei* 10230; 3 – *B. cepacia* 25416; 4 – *B. thailandensis* 264

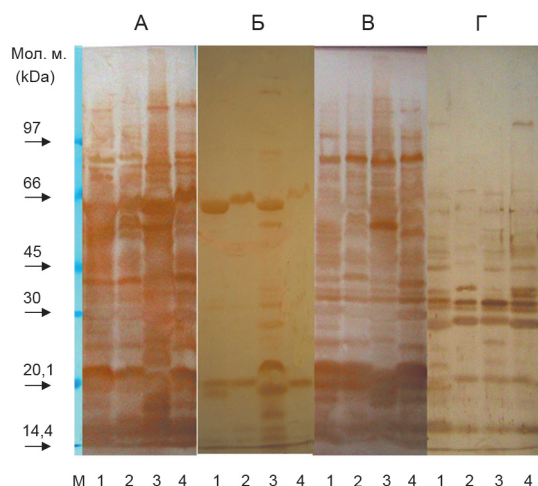


Рис. 3. Иммуноэлектрофорез суммарных клеточных антигенов буркхольдрий после иммуноблоттинга с иммунными сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА *B. cepacia* 25416 и *B.t thailandensis* 264:

Обозначения иммуноэлектрофорезов: А – с сывороткой к клеточным антигенам *B. cepacia* 25416; Б – с сывороткой к ЭЦА *B. cepacia* 25416; В – с сывороткой к клеточным антигенам *B. thailandensis* 264; Г – с сывороткой к ЭЦА *B. thailandensis* 264. М – трек с маркерными белками. Обозначения треков с антигенами штаммов: 1 – *B. pseudomallei* C-141; 2 – *B. mallei* 10230; 3 – *B. cepacia* 25416; 4 – *B. thailandensis* 264

позволяющего дифференцировать патогенные виды буркхольдрий.

Воспроизводимость иммуноэлектрофорезов, вычисленная для полученных сывороток как среднее значение коэффициентов сходства Дайса, имела значения от 91 до 95 %.

Таким образом, проведенный анализ полученных иммуноэлектрофорезов клеточных антигенов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* в иммуноблоттинге с иммунными сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА четырех видов буркхольдрий выявил отдельные фракции, присутствующие в антигенных спектрах штаммов одного патогенного вида и отсутствующие в спектрах штаммов другого патогенного вида, которые позволяют дифференцировать эти виды. Достигнутая воспроизводимость иммуноэлектрофорезов позволяет использовать их в сравнительном анализе сходства спектров антигенных фракций анализируемых видов с применением компьютерных программ.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бейли Н. Математика в биологии и медицине. М.: Мир; 1970.  
 2. Будченко А.А., Илюхин В.И., Викторов Д.В. Сравнительный анализ электрофорезов суммарных клеточных белков патогенных буркхольдрий. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2005; 2:24–8.  
 3. Домарадский И.В. Проблемы перекрестного иммунитета. М.: Медицина; 1973.  
 4. Илюхин В.И., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г., Антонов В.А., Меринова Л.К., Сенмова И.К. *Burkholderia thailandensis*: биологические свойства, идентификация и таксономическая позиция. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2002; 1:7–11.  
 5. Кулаков Ю.К., Желудков М.М., Толмачева Т.А.

Использование молекулярно-биологических методов идентификации бруцелл в сравнительном анализе штаммов, выделенных от больных собак. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2003; 1:6–14.

6. Anuntagool N., Rugdech P., Sirisinha S. Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(1):1232–6.  
 7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248–54.  
 8. Katz J., Devvald R., Nicholson J. Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia eaii*, *Babesia eaballi*, *Trypanosoma euiperdum* and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000; 12:46–50.  
 9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680–5.  
 10. Pal V., Kumar S., Malik P., Rai G.P. Evaluation of Recombinant Proteins of *Burkholderia mallei* for Serodiagnosis of Glanders *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19:1193–8.  
 11. Sermswan R.W., Wongratanacheewin S., Anuntagool N. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. *J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 63:146–9.  
 12. Tiyawisutsri R., Peacock S.J., Langa S., Limmathurotsakul D., Cheng A.C., Chierakul W., Chaowagul W., Day N.P., Wuthiekanun V. Antibodies from patients with Melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemagglutination assay. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:4872–4.  
 13. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76:4350–4.

References

1. Beily N. [Mathematics in Biology and Medicine]. М.: Mir; 1970.  
 2. Budchenko A.A., Ilyukhin V.I., Viktorov D.V. [Comparative analysis of electrophoreses of bulk cell proteins in pathogenic Burkholderia]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2005; 2:24–8.  
 3. Domaradsky I.V. [Problems of Cross-Protective Immunity]. М.: Meditsina; 1973.  
 4. Ilyukhin V.I., Senina T.V., Plekhanova N.G., Antonov V.A., Merinova L.K., Seimova I.K. [*Burkholderia thailandensis*: biological properties, identification and taxonomic position]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2002; 1:7–11.  
 5. Kulakov Yu.K., Zheludkov M.M., Tolyacheva T.A. [Application of molecular-genetic methods for Brucella identification in comparative assay of the strains isolated from infected dogs]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2003; 1:6–14.  
 6. Anuntagool N., Rugdech P., Sirisinha S. Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(1):1232–6.  
 7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248–54.  
 8. Katz J., Devvald R., Nicholson J. Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia eaii*, *Babesia eaballi*, *Trypanosoma euiperdum* and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000; 12:46–50.  
 9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680–5.  
 10. Pal V., Kumar S., Malik P., Rai G.P. Evaluation of Recombinant Proteins of *Burkholderia mallei* for Serodiagnosis of Glanders *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19:1193–8.  
 11. Sermswan R.W., Wongratanacheewin S., Anuntagool N. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. *J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 63:146–9.  
 12. Tiyawisutsri R., Peacock S.J., Langa S., Limmathurotsakul D., Cheng A.C., Chierakul W., Chaowagul W., Day N.P., Wuthiekanun V. Antibodies from patients with Melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemagglutination assay. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:4872–4.  
 13. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76:4350–4.

Authors:

Budchenko A.A., Mazurova I.Yu., Ilyukhin V.I. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Будченко А.А., Мазурова И.Ю., Илюхин В.И. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 30.09.14.