

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, cellular 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 сенсibilизации 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 – 10⁹ 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 У.К.Лаемли [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-

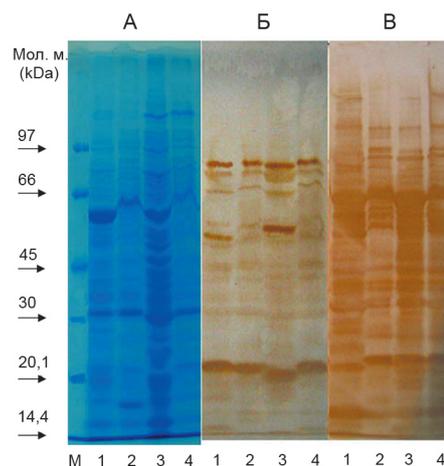


Рис. 1. Электрофореграммы и иммуноэлектрофореграммы клеточных антигенов буркхольдерий:

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,

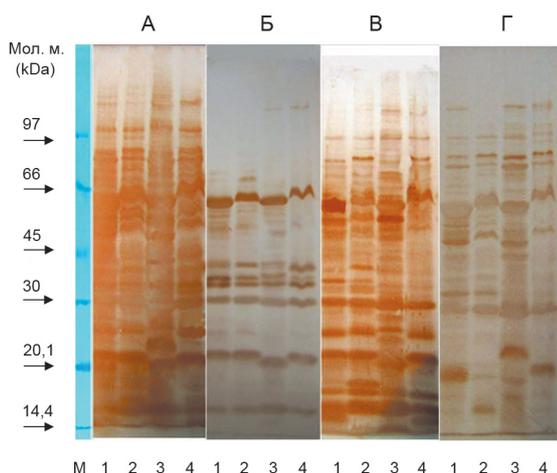


Рис. 2. Иммуноэлектрофореграммы клеточных антигенов буркхольдерий после иммуноблоттинга с иммунными сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА *B. pseudomallei* C-141 и *B. mallei* 10230:

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

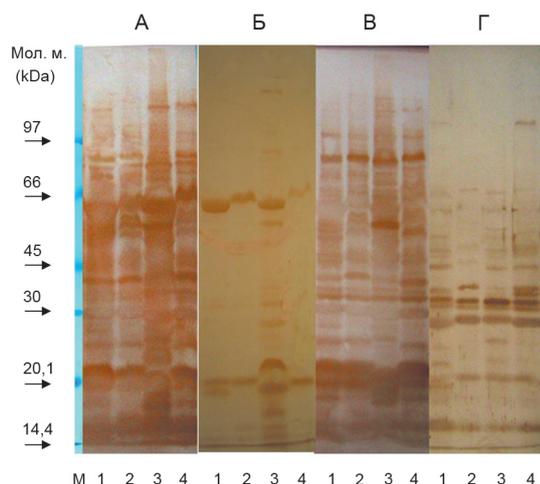


Рис. 3. Иммуноэлектрофорез суммарных клеточных антигенов буркхольдрий после иммуноблоттинга с иммунными сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА *B. cepacia* 25416 и *B.t thailandensis* 264:

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. Tiyawisuttri 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. Tiyawisuttri 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.