

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

С.В.Балахонов<sup>1</sup>, Е.С.Куликалова<sup>1</sup>, А.В.Мазепа<sup>1</sup>, А.К.Сынгеева<sup>1</sup>,  
А.С.Остяк<sup>1</sup>, Е.П.Михайлов<sup>2</sup>, И.И.Ешелкин<sup>2</sup>, В.А.Шестаков<sup>2</sup>

### РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ FRANCISELLA TULARENSIS, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ЮГЕ СИБИРИ (1950 — 2015 ГГ.)

<sup>1</sup>Иркутский научно-исследовательский противочумный институт; <sup>2</sup>Алтайская противочумная станция, Горно-Алтайск

*Цель.* Исследование таксономической принадлежности коллекционных штаммов возбудителя туляремии на основе протеометрического и молекулярно-генетического методов идентификации. *Материалы и методы.* В работе использовано 23 штамма туляремийного микроба, изолированных в Красноярском крае и Республике Алтай с 1950 по 2015 гг. Для культивирования возбудителя использовался FT-агар. Спектры для время-пролетной масс-спектрометрии собирались на приборе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) и анализировались в сравнении с предварительно дополненной базой данных программы MALDI Biotyper 3.0. ПЦР со специфическими праймерами проводилась с электрофоретической визуализацией результатов и в режиме реального времени. *Результаты.* Установлено, что штаммы *F. tularensis*, выделенные на юге западной Сибири с 1950 до 2010 гг., относятся к подвиду *holarctica*, из них 56,3% — эритромицин-чувствительные (I биовар Ery<sup>S</sup>), остальные — эритромицин-резистентные (II биовар Ery<sup>R</sup>). Семь штаммов, изолированных после 2011 г., по цитруллинуреидазной активности, расщеплению глицерина и наличию фрагментов *rdpA* и *rdpD* острова патогенности (FPI) определены как среднеазиатский подвид. *Заключение.* Результаты ретроспективного исследования биологических свойств штаммов *F. tularensis*, выделенных на юге Сибири, показало отсутствие в коллекции Иркутского противочумного института до 2011 г. возбудителя туляремии среднеазиатского подвида. Обнаружение указанного подвида на территории Российской Федерации свидетельствует о необходимости изучения и анализа вопросов эпидемиологии, экологии и эпизоотологии возбудителя туляремии среднеазиатского подвида, а также определения границ его распространения.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 3—9

Ключевые слова: туляремия, *Francisella tularensis*, масс-спектрометрия, MALDI-TOF масс-спектрометрия, ПЦР, природные очаги

S.V.Balakhonov<sup>1</sup>, E.S.Kulikalova<sup>1</sup>, A.V.Mazepa<sup>1</sup>, A.K.Syngeeva<sup>1</sup>,  
A.S.Ostyak<sup>1</sup>, E.P.Mikhailov<sup>2</sup>, I.I.Eshelkin<sup>2</sup>, V.A.Shestakov<sup>2</sup>

### RETROSPECTIVE ANALYSIS OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF FRANCISELLA TULARENSIS COLLECTION STRAINS ISOLATED IN SOUTH SIBERIA (1950 — 2015)

<sup>1</sup>Irkutsk Research Institute for Plague Control; <sup>2</sup>Altai Station for Plague Control, Gorno-Altaysk, Russia

*Aim.* Study taxonomic belonging of collection strains of tularemia causative agent based on proteomic and molecular-genetic methods of identification. *Materials and methods.* 23 strains of tularemia were used in the study, isolated from Krasnoyarsk region and Altai Republic from 1950 to 2015. FT-agar was used for the cultivation. Spectra for time-of-flight mass-spectrometry were

collected using Microflex LT (Bruker Daltonics, Germany) and analyzed compared with previously collected enhanced database of MALDI Biotyper 3.0. PCR with specific primers was carried out with electrophoretic visualization of results in real time. *Results.* *F. tularensis* strains isolated from south of western Siberia from 1950 to 2010 were established to belong to subspecies *holarctica*, and 56.3% of those — erythromycin sensitive (I biovar Ery<sup>S</sup>), the rest — erythromycin-resistant (II biovar Ery<sup>R</sup>). 7 strains isolated after 2011 by citrulline ureidase activity, cleavage of glycerin and presence of pdpA and pdpD fragments of pathogenicity island (FPI) were determined as Central Asian subspecies. *Conclusion.* Results of a retrospective study of biological properties of *F. tularensis* strains isolated from south Siberia have shown the lack of Central Asian subspecies tularemia causative agent in the collection of Irkutsk Institute for Plague Control before 2011. Detection of this subspecies in Russian Federation gives evidence on the necessity to study and analyze problems of epidemiology, ecology and epizootology of Central Asian subspecies tularemia causative agent as well as determination of borders of its spread.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 3—9

Key words: tularemia, *Francisella tularensis*, mass-spectrometry, MALDY-TOF mass-spectrometry, PCR, natural foci

## ВВЕДЕНИЕ

Туляремия — природно-очаговая инфекция, приуроченная к многокомпонентным биоценоотическим системам, способная вызывать массовые эпидемические вспышки и эпизоотии. На территории Российской Федерации широко распространены природные очаги туляремии, где циркулирует голарктический подвид возбудителя — *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. В Казахстане, помимо голарктического подвида, по долинам пустынных рек в природных очагах тугайного типа обнаруживается микроорганизм среднеазиатского подвида — *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* [1]. На территории граничащего с Казахстаном Алтайского края и Республики Алтай находится Алтайский предгорно-ручьевого очаг туляремии. Заболевания туляремией регистрировались в этом очаге на территории Восточно-Казахстанской области в 2011 г. [4]. Последний случай туляремии в этом очаге на территории России зарегистрирован в 2015 г. у невакцинированной против туляремии жительницы с. Большой Лог Крутихинского района Алтайского края. Заражение произошло в результате присасывания иксодового клеща на собственной усадьбе. Эпизоотологическое обследование подворья выявило четыре серопозитивных на туляремию мыши (из шести отловленных). По данным 2015 г. циркуляция возбудителя подтверждена серологически в 598 пробах биоматериала из 18 районов края титрами от 1:20 до 1:320 (РНAt, РНГА). Ранее (до 2011 г.) на территории Алтайского края отмечалось выделение из объектов окружающей среды штаммов возбудителя туляремии голарктического подвида. Однако в 2011 г. из шести изолятов туляремийного микроба, выделенных от иксодовых клещей, отловленных в Алтайском крае, три (из биотопов Ельцовского, Первомайского, Шелаболихинского районов) впервые отнесены к среднеазиатскому подвиду [3, 6]. Изолированный в 2015 г. в Каратузском районе Красноярского края штамм туляремийного микроба также идентифицирован (Референс-центр по мониторингу за природно-очаговыми инфекциями на базе Иркутского научно-исследовательского противочумного института) как возбудитель туляремии среднеазиатского подвида.

Цель работы — изучение таксономической принадлежности выделенных на территории Красноярского края и Республики Алтай с 1950 по 2015 гг.

коллекционных и свежeweделенных штаммов возбудителя туляремии на основе протеометрического и молекулярно-генетического методов идентификации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовано 23 штамма туляремиального микроба, выделенных в Красноярском крае и Республике Алтай в период с 1950 по 2015 гг. (табл.). Все штаммы получены из коллекции Музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института, где хранились в лиофилизированном состоянии при 4°С.

Исследование видовых и подвидовых свойств взятых в исследование штаммов проводилось общепринятыми методами [5], а также с использованием современных подходов к идентификации микроорганизмов — протеометрических и молекулярно-генетических методов.

Для культивирования в процессе исследования туляремиального микроба использовался FT-агар (рН 7,0) производства ГНЦ ПМБ (пос. Оболенск). Хранение культур возбудителя туляремии осуществлялось на желточной среде Мак-Коя на протяжении двух месяцев при температуре 5°С с последующим пересевом.

Данные о штаммах *F. tularensis*, взятых в исследование

| Инв. № штамма | Объект выделения                                   | Год выделения | Место выделения (очаг)   |
|---------------|--|---------------|--|
| И-1           | человек (бубон)                                    | 1950          | Красноярский край, Бирилюсский р-н                                   |
| И-6           | комары <i>Aedes vexans</i>                         | 1950          | Красноярский край, Бирилюсский р-н                                   |
| И-94          | полевки водяные <i>Arvicola terrestris</i>         | 1958          | Республика Алтай, Майминский р-н, ручей Бочкаревка                   |
| И-95          | мыши полевые <i>Arodemus agrarius</i>              | 1958          | Республика Алтай, Майминский р-н, Мокрый Лог, ручей №2               |
| И-111         | клещи <i>Haemaphysalis concinna</i>                | 1959          | Республика Алтай, Майминский р-н, г. Горно-Алтайск, ручей Бочкаревка |
| И-125         | клещи <i>Dermacentor silvarum</i>                  | 1960          | Республика Алтай, Майминский р-н, г. Горно-Алтайск, ручей Бочкаревка |
| И-126         | суслик длиннохвостый <i>Spermophilus undulatus</i> | 1960          | Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, оз. Кара-Куль                    |
| И-127         | полевка узкочерепа <i>Microtus gregalis</i>        | 1960          | Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, оз. Кара-Куль                    |
| И-129         | кутора <i>Neomys spp.</i>                          | 1960          | Республика Алтай, Кош-Агачский р-н, оз. Кара-Куль                    |
| И-283         | бурозубки <i>Sorex spp.</i>                        | 1971          | Республика Алтай, Майминский р-н                                     |
| И-367         | обыкновенные полевки <i>M. arvalis</i>             | 1989          | Красноярский край, Ужурский р-н, окр. пос. Ужур                      |
| И-368         | полевые мыши <i>A. agrarius</i>                    | 1989          | Красноярский край, Ужурский р-н, с. Солган                           |
| И-390         | бурозубка <i>Sorex spp.</i>                        | 2012          | Красноярский край, Каратузский р-н, пос. Марьян Лог                  |
| И-391         | труп кошки <i>Felis silvestris catus</i>           | 2012          | Красноярский край, Кежемский р-н, п. Кежма                           |
| И-392         | ондатра <i>Ondatra zibethicus</i>                  | 2012          | Красноярский край, Кежемский р-н, п. Кежма                           |
| И-393         | ондатра <i>O. zibethicus</i>                       | 2012          | Красноярский край, Кежемский р-н, п. Кежма                           |
| И-394 (310)   | клещи <i>H. concinna</i>                           | 2015          | Красноярский край, Каратузский р-н, с. Чубчиково                     |
| И-396 (77)    | клещи <i>H. concinna</i>                           | 2015          | Республика Алтай, Майминский р-н, ручей Бакала                       |
| И-397 (87)    | клещи <i>H. concinna</i>                           | 2015          | Республика Алтай, Майминский р-н, р. Б. Шарара                       |
| И-398 (196)   | клещи <i>H. concinna</i>                           | 2015          | Республика Алтай, Чойский р-н, окр. с. Паспаул                       |
| И-399 (198)   | клещи <i>D. silvarum</i>                           | 2015          | Республика Алтай, Чойский р-н, окр. Ашпанак                          |
| И-400 (193)   | клещи <i>H. concinna</i>                           | 2015          | Республика Алтай, Чойский р-н, р. Уба-2                              |
| И-401 (195)   | клещи <i>H. concinna</i>                           | 2015          | Республика Алтай, Чойский р-н, р. Уба-1                              |

Качество питательных сред определялось с учетом чувствительности и скорости роста микроба. Штаммы туляремийного микроба выращивались в течение 48 ч при температуре 37°C, после чего проводилось изучение их культурально-морфологических свойств и ферментативной активности в отношении глицерина и цитруллина. В каждую пробирку засеивалась полная петля агаровой культуры. Пробирки с посевами помещались в термостат при 37°C.

Метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) осуществляли таким образом. После инкубации в течение 24 — 48 ч при 37°C штаммов туляремийного микроба из них готовились белковые препараты: к водной суспензии одной изолированной колонии добавлялся 96% этанол, тщательно перемешивался на микроцентрифуге-вортексе, клетки осаждались центрифугированием при 13 тыс. об./мин. К осадку добавлялся 70% водный раствор муравьиной кислоты и равный объем ацетонитрила, центрифугировался при 13 тыс. об./мин. Супернатант в количестве 1 мкл наносился в лунки MSP-чипа (мишени); после подсыхания на каждую лунку наслаивался 1 мкл насыщенного водного раствора  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты, содержащей 50 % ацетонитрила и 2,5 % трифторуксусной кислоты. После высушивания чип помещался в камеру масс-анализатора и проводился сбор спектров.

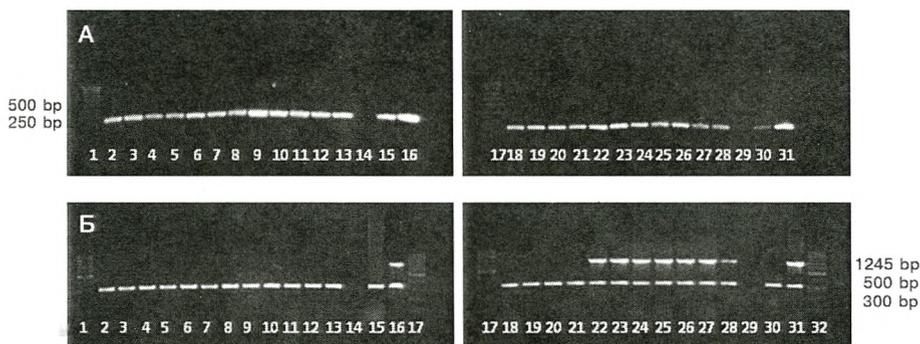
Сбор спектров проводился в автоматическом режиме на масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Полученные в процессе сбора исходные спектры подвергали анализу в сравнении с базой данных программы MALDI Biotyper 3.0 для идентификации штаммов.

Предварительно проделана работа по созданию базы референсных спектров представителей четырех подвидов туляремийного микроба (*F. tularensis* ssp. *holarctica* I Ery<sup>S</sup> 15B НИИЭГ, *F. tularensis* ssp. *holarctica* I Ery<sup>S</sup> 250, *F. tularensis* ssp. *holarctica* II Ery<sup>R</sup> 94, *F. tularensis* ssp. *mediaasiatica* A-120, *F. tularensis* ssp. *tularensis* Schu-11, *F. tularensis* ssp. *novicida* Utah 112) [2].

Заключение о таксономической принадлежности микроорганизма давалось на основании значения индекса совпадения (параметр score value, SV). Значение SV  $\geq 2,3$  соответствовало достоверной идентификации до вида; SV менее 2,299, но более 2,000 — достоверной идентификации до рода, вероятной идентификации до вида; значение SV в диапазоне 1,7 — 1,999 рассматривалось как вероятная идентификация до рода и менее 1,7 — недостоверный результат.

Выявление видоспецифических генов *F. tularensis* проводилось с помощью «Набора реагентов для выявления ДНК *F. tularensis* методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в реальном времени» производства РосНИПЧИ «Микроб» на амплификаторе и Rotor-Gene Q (QIAGEN), а также с использованием праймеров *tul4* на термоциклере «Терцик» [7] (производства ЗАО «Синтол»). Гены *rdpA* и *rdpD* острова патогенности для определения подвида туляремийного микроба детектировались по методу F.E. Nano et al. [8] (праймеры производства ЗАО «Синтол»).

Учет результатов амплификации проводился с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в присутствии 1-кратного TBE-буфера (0,089 М трис-ОН; 0,089 М  $H_3BO_3$ ; 0,002 М EDTA) при напряжении 160 В и силе тока 67 мА в течение 30 минут. Фрагменты амплифицированной ДНК сравнивались с маркером молекулярного веса 100 бп производства ЗАО «Синтол», просматривались в проходящем УФ-свете и видеорегистрировались.



#### Определение специфических фрагментов ДНК исследуемых штаммов *F. tularensis*.

##### А. Фрагменты гена *tul4*. Б. Фрагменты генов *rdpA* и *rdpD*.

Дорожки 1, 17, 32 — маркер молекулярного веса, ДНК 100 bp; 2-13, 18-28: амплификаты ДНК штаммов *F. tularensis*. 2 — И-1; 3 — И-6; 4 — И-94; 5 — И-95; 6 — И-111; 7 — И-125; 8 — И-126; 9 — И-127; 10 — И-129; 11 — И-283; 12 — И-367; 13 — И-368; 18 — И-390; 19 — И-391; 20 — И-392; 21 — И-393; 22 — И-394; 23 — И-396; 24 — И-397; 25 — И-398; 26 — И-399; 27 — И-400; 28 — И-401. Дорожки 14, 29 — отрицательный контроль; 15, 30 — положительный контроль (*F. tularensis* ssp. *holarctica* 15В). Дорожки 16, 31 — положительный контроль (*F. tularensis* ssp. *mediasiatica* 357).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологические свойства штаммов туляремийного микроба разных подвидов, выделенных на территории южной Сибири, определялись по комплексу тестов — культурально-морфологических, биохимических, молекулярно-генетических и вирулентности. Все изоляты принадлежат к виду *Francisella tularensis*, морфологически представляют собой мелкие полиморфные грамотрицательные палочки, не растущие на обычных питательных средах. Все штаммы агглютинируются до титра или  $1/2$  титра туляремийной сывороткой и дают специфическое свечение в реакции иммунофлуоресценции.

Полученные в результате масс-спектрометрической идентификации спектры были визуализированы в виде графиков, где по оси *x* обозначена величина отношения массы к заряду, а по оси *y* — интенсивность сигнала. В результате сравнения с референсной базой данных спектры исследуемых штаммов *F. tularensis* достоверно идентифицированы до вида, Score Value 2,21 — 2,63 (совпадение с биохимическим и молекулярно-генетическим методом — 100 %). Внутривидовую дифференциацию по подвиду и биовару провести не удалось, значимых различий в белковых профилях между штаммами не выявлено.

В ПЦР выявлена генетическая однородность в отношении всех штаммов по видоспецифичным для *F. tularensis* фрагментам *igl-1BC* гена (268 п.н.) тест-системы «Ген *Francisella tularensis* — РГФ» и гену *tul4* (250 п.н.), кодирующему один из основных Т-клеточных мембранных белков возбудителя туляремии (рис. А). Все изученные изоляты высоковирулентны, летальная доза для мышей составляет одна микробная клетка.

Установлено, что штаммы *F. tularensis*, выделенные на юге западной Сибири до 2011 г., не обладают цитруллинуреидазной активностью и не расщепляют глицерин, что позволяет отнести данные штаммы к голарктическому подвиду. По наличию фрагментов острова патогенности FPI (*Francisella pathogen island*) у вышеперечисленных штаммов обнаружен только один фрагмент острова патогенности *rdpA* (рис. Б). Из этих штаммов 56,3% эритромицин-

чувствительны, отнесены к I биовару Ery<sup>S</sup>, остальные культуры подвида *holarctica* — ко II биовару Ery<sup>R</sup>.

Штаммы *F. tularensis* И-394, И-396, И-397, И-398, И-399, И-400, И-401 обладают цитруллинуреидазной активностью и расщепляют глицерин. Кроме того, выявлены обе геномные области *pdpA* и *pdpD* острова патогенности (FPI), характерные для микроорганизмов среднеазиатского подвида.

Три вирулентных штамма *Francisella tularensis* подвида *mediaasiatica* с генотипом *tul4<sup>+</sup> pdpA<sup>+</sup> pdpD<sup>+</sup>* (выделены от клещей на территории Каратузского района Красноярского края, Майминского и Чойского района Республики Алтай) депонированы в Госколлекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» с присвоением номеров В-7892, В-7893, В-7894 соответственно.

Таким образом, установлено, что коллекционные штаммы туляремийного микроба, выделенные с 1950 по 2010 гг. на территории Республики Алтай и Красноярского края, относятся к голарктическому подвиду — *F. tularensis* ssp. *holarctica*. Обнаруженный впервые в Алтайском крае в 2011 г. [6], а затем в Республике Алтай и в Красноярском крае в 2015 г. возбудитель среднеазиатского подвида ранее на этих территориях не выявлялся. В 2016 г. при оперативной идентификации в Референс-центре по мониторингу за природно-очаговыми инфекциями на базе Иркутского научно-исследовательского противочумного института из 17 штаммов *Francisella tularensis* (выделены из воды в Алтайском и Красногорском районах; из клещей в Чойском районе, с. Паспаул, Майминском районе, Ак-Кол, Алтайском районе, Верх-Ая, выше Верх-Ая, Красногорском районе, с. Луговое Республики Алтай) по комплексу молекулярно-генетических и биохимических свойств девять отнесены к подвиду *holarctica*, а восемь — к подвиду *mediaasiatica*.

Таким образом, в результате проведенного исследования таксономических свойств коллекционных штаммов *F. tularensis*, выделенных на территории Республики Алтай и Красноярского края в 1950 — 2010 гг., с применением высокотехнологичных методов идентификации установлена их принадлежность к подвиду *holarctica*. Регистрация случаев заболеваний на территории трансграничного с Казахстаном предгорно-ручьевого очага туляремии; изоляция высоковирулентных штаммов туляремийного микроба двух подвидов; инфицирование объектов окружающей среды (кровососущие членистоногие, вода открытых водоемов, мелкие млекопитающие) указывают на неблагоприятную эпидемиологическую ситуацию в отношении этой опасной природно-очаговой инфекции и на существование риска возникновения эпидемических осложнений у местного населения, а также у посещающих с различными целями рекреационные зоны природных биотопов. Выявление изолятов туляремийного микроба среднеазиатского подвида из объектов окружающей среды Алтайского края, Республики Алтай и Красноярского края, начиная с 2011 г., свидетельствует о необходимости изучения вопросов эпидемиологии, экологии и эпизоотологии возбудителя туляремии среднеазиатского подвида, а также тщательного эпидемиологического и эпизоотологического мониторинга природного очага для определения границ его распространения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнов Ю.И., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С. Туляремия в Казахстане. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2009, 3: 40-46.
2. Балахонов С.В., Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Куликалова Е.С., Остяк А.С. MALDI-ToF масс-спектрометрическое определение видовой принадлежности патогенов в со-

- вершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями. Бактериология. 2016, 1 (1): 88-94.
3. Кудрявцева Т.Ю., Транквилевский Д.В., Мокриевич А.Н., Попов В.П., Морозова Н.С., Зароченцев М.В., Мазепа А.В., Окунев Л.П., Холин А.В., Косилко С.А., Федоров Ю.М., Храмов М.В., Дятлов И.А. Эпизоотическая и эпидемическая ситуации по туляремии в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 1: 28-32.
  4. Куница Т.Н., Избанова У.А., Мека-Меченко В.Г., Майканов Н.С., Садовская В.П. Эпизоотическая активность природных очагов туляремии Казахстана на приграничной с Россией территории. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2014, 25: 63-65.
  5. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев (ред.). М., Шико, 2013.
  6. Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Губарева Т.И., Павлов В.М., Дятлов И.А. Выделение среднеазиатского подвида туляреминого микроба на территории Алтайского края. Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 1: 66-69.
  7. Long G.W., Oprandy J.J., Narayanan R.B. et al. Detection of Francisella tularensis in blood by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1993, 31 (1): 152-154.
  8. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C. et al. A Francisella tularensis pathogenicity island required for intramacrophage growth. J. Bacteriol. 2004, 186: 6430-6436.

Поступила 25.12.16

Контактная информация: Балахонов С.В.,  
664002, Иркутск, ул. Трилиссера, 78, р. т. (3952)23-99-85

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Д.В.Ульшина, Д.А.Ковалев, Д.Г.Пономаренко, Д.В.Русанова,  
Н.М.Швецова, Т.В.Таран, И.В.Кузнецова, А.М.Жиров,  
А.А.Хачатурова, И.Ю.Борздова, А.Н.Куличенко*

## **ПРИМЕНЕНИЕ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА В ОБРАЗЦАХ КРОВИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Изучение возможности применения метода времяпролетной масс-спектрометрии для выявления возбудителя бруцеллеза в крови. *Материалы и методы.* Штаммы бруцелл: 5 Brucella melitensis и 21 Brucella abortus. Белковое профилирование в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex «Bruker Daltonics». *Результаты.* Модифицирована и оптимизирована методика обеззараживания и пробоподготовки образцов крови, контаминированной бруцеллами, для анализа методом MALDI-TOF MS. Получены 120 репрезентативных белковых профилей экстрактов образцов крови, содержащей возбудитель бруцеллеза. Сформирован и проанализирован результирующий пик-лист (супер-спектр) исследуемой белковой фракции экстракта крови условно здорового человека в пределах исследуемой группы. *Заключение.* Предложена схема выявления бруцелл в образцах крови методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, основанная на выявлении комплекса 15 родоспецифичных фрагментов. Охарактеризованы сигналы на масс-спектрах экстрактов лейкоцитарной фракции крови, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 9—17

Ключевые слова: возбудитель бруцеллеза, кровь, масс-спектрометрия, белковое профилирование, выявление