

4. Cheng D., Qiao L., Horvatovich P. Toward Spectral Library-Free Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Bacterial Identification. *Journal of proteome research*. 2018, 17 (6): 2124-2130.
5. Hsieh S.Y., Tseng C.L., Lee Y.S. et al. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol. Cell Proteomics*. 2008, 7: 448-456.
6. Köck R., Wüllenweber J., Horn D. et al. Implementation of short incubation MALDI-TOF MS identification from positive blood cultures in routine diagnostics and effects on empiric antimicrobial therapy. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2017, 6 (1): 12-18.
7. Seng P., Abat C., Rolain J.M. et al. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2013, 51: 2182-2194.
8. van Belkum A., Welker M., Pincus D. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: what are the current issues? *Annals of laboratory medicine*. 2017, 37 (6): 475-483.

Поступила 26.02.19

Контактная информация: Ульшина Д.В.,
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р. т. (8652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Е.А.Котенева, Е.С.Котенев, А.В.Калинин, Н.С.Царева, Л.А.Кот, Н.В.Жаринова, А.А.Зайцев, Г.А.Печковский

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ШТАММОВ YERSINIA PESTIS, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА И ЗАКАВКАЗЬЯ

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Создание базы данных масс-спектров штаммов *Yersinia pestis*, позволяющей дифференцировать штаммы основного и кавказского подвидов возбудителя чумы методом MALDI-TOF MS. *Материалы и методы.* Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии было исследовано 50 штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на территории 7 природных очагов чумы Кавказа и Закавказья в период 1950-2012 г. Снятие масс-спектров экстрактов клеток *Y. pestis* проводили с использованием масс-спектрометра Microflex LT «Bruker Daltonics». Результаты обрабатывали и анализировали в программах «FlexAnalysis» и MALDI Biotyper v. 3.0. *Результаты.* Показано, что масс-спектры имеют характерные особенности, позволяющие дифференцировать штаммы основного (*pestis*) и неосновного подвидов. Выявлены пики, характерные для каждого подвида, наличие у *Y. pestis* подвида *saucasica* пиков, характерных для предковой формы — *Y. pseudotuberculosis* указывает на древнее происхождение этой группы, что согласуется в данными молекулярно-генетического и WGS анализа, приведенными в публикациях отечественных и зарубежных авторов. *Заключение.* Показана возможность применения метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для быстрой дифференциации штаммов чумы основного и неосновного подвида, имеющих разное значение в развитии и поддержании эпизоотического процесса в природных очагах чумы, а также разную вирулентность для человека. Идентификация штамма до уровня подвида требует проведения культуральных и биохимических тестов, которые могут занять несколько суток. Предлагаемый метод позволяет провести дифференциацию и получить результат уже через полчаса после получения чистой культуры.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 18—25

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, MALDI-TOF масс-спектрометрия, внутривидовое типирование штаммов, природные очаги чумы, идентификация штаммов, специфические пики

PROTEOMIC PROFILING OF *YERSINIA PESTIS* STRAINS CIRCULATING IN THE AREA OF NATURAL PLAGUE FOCI OF NORTH CAUCASUS AND TRANSCAUCASIA

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. To create a database of mass spectra of *Yersinia pestis* strains, which will differentiate the strains of the main and Caucasian subspecies of the plague agent by MALDI-TOF MS. *Materials and methods.* MALDI-TOF mass spectrometry was used to study 50 strains of *Y. pestis*, isolated on the territory of 7 natural plague foci of the Caucasus and Transcaucasia in the period 1950–2012. The removal of mass spectra of extracts of cells of *Y. pestis* was performed using the mass spectrometer Microflex LT «Bruker Daltonics». The results were processed and analyzed in FlexAnalysis programs, and MALDI Biotyper V. 3.0. *Results.* This study showed that mass spectra have characteristic features that allow differentiating strains of the main (*Y. pestis pestis*) and subspecies (*Y. pestis caucasica*). Peaks characteristic of each subspecies were detected. The presence in *Y. pestis caucasica* subspecies peaks characteristic of the ancestral form — *Y. pseudotuberculosis* indicates the ancient origin of this group, which is consistent with the data of molecular genetic and WGS analysis given in other publications. *Conclusion.* This work shows the possibility of applying the MALDI-TOF method of mass spectrometry for rapid differentiation of strains of the main subspecies *Y. pestis pestis* from the subspecies *Y. pestis caucasica*, which have different significance in the development and maintenance of the epizootic process in natural plague foci as well as different virulence for humans. Identification of the strain to the subspecies level requires carrying out culture and biochemical tests, which can take several days. The proposed method makes it possible to differentiate and obtain a result within half an hour after receiving a pure culture.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 18–25

Key words: *Yersinia pestis*, MALDI-TOF MS, intraspecific typing of strains, natural foci of plague, identification of strains, specific peaks

ВВЕДЕНИЕ

Чума — зоонозная природно-очаговая бактериальная инфекция. На территории Российской Федерации находятся 11 природных очагов чумы. Общая площадь энзоотичной по чуме территории составляет 222,4 тыс. км². Эпизоотии чумы в период с 2000 по 2015 годы зарегистрированы в 8 из 11 природных очагов, в которых выделено 1709 штаммов микроба чумы. С 2014 г. в России ежегодно отмечаются случаи заболевания человека чумой [2]. Устойчивая тенденция активизации ряда природных очагов чумы указывает на необходимость усиления роли эпизоотологического мониторинга для предотвращения случаев заболевания.

На территории Северного Кавказа и Закавказья циркулируют различные варианты *Yersinia pestis*. В Центрально-Кавказском высокогорном (01), Терско-Сунженском низкогорном (02), Дагестанском равнинно-предгорном (03), Прикаспийском Северо-Западном степном (14) и Прикаспийском песчаном (43) циркулируют штаммы *Yersinia pestis subsp. pestis*, а в Восточно-Кавказском высокогорном (39), Закавказском высокогорном (04-06), Терско-Сунженском низкогорном (02) — штаммы *Y. pestis subsp. caucasica*.

Дифференциация и типирование штаммов микроба чумы, выделенных на территории очагов, имеет большое значение для оценки степени напряженности эпизоотического процесса, выявления путей распространения возбудителя [13].

В последнее десятилетие в видовой идентификации микроорганизмов активно используется технология «мягкого» способа ионизации молекул исследуемого вещества, реализуемая в методе MALDI-TOF масс-спектрометрии. Данный метод позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции микробных клеток (т.е. прямое белковое профилирование) и получать уникальные

для каждого вида масс-спектры [5, 12, 14]. Для идентификации микроорганизмов необходимо наличие эталонных спектров данного вида, представляющих собой суперспектры (усредненные серии единичных спектров), сравнение с которыми позволяет добиться большой точности и воспроизводимости анализа. Коммерческие базы данных для идентификации микроорганизмов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии не содержат референс-спектров возбудителей особо опасных инфекций, в том числе референтных масс-спектров штаммов *Y. pestis*, что значительно ограничивает возможности использования данного метода. Поэтому очевидна необходимость создания базы масс-спектров штаммов *Y. pestis*, циркулирующих на территории природных очагов Северного Кавказа и Закавказья, где находится значительная часть (5 из 11) природных очагов чумы в Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 50 штаммов *Y. pestis*, изолированных в период с 1950 по 2012 годы на территории 7 природных очагов Северного Кавказа и Закавказья (табл.). Все штаммы предварительно идентифицированы до подвида [3]. Штаммы *Y. pestis* выращивали на LB агаре (по Ленноксу) при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Обеззараживание штаммов *Y. pestis* и экстракцию кислоторастворимых белков проводили по ранее предложенному методу [9]. Дополнительно лизат фильтровали через PVDF фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Далее в фильтрат добавляли равный объем 50% ацетонитрила, после чего использовали для MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа. Для контроля специфической стерильности белковых экстрактов штаммов *Y. pestis* их нейтрализовали [7] и делали контрольные высевы каждого образца на 5 чашек с LB агаром, которые инкубировали в течение 5 суток при 28°C с ежедневным просмотром посевов. Во время проверки на специфическую стерильность образцы белковых экстрактов хранили при (-80°C) .

В работе были использованы питательные среды: LB Broth (Amresco LLC), Tryptic soy broth (Liofilchem, Italy), Microbiology agar (Sigma, USA); реактивы: L-histidine (Amresco LLC), TWEEN-80, pure (AppliChem, Germany), TFA (trifluoroacetic acid spectroscopy grade, ultrapure) (AppliChem, Germany), Acetonitrile (HPLC-gradient grade), Bacterial Test Standart (Bruker Daltonics, Germany), α -цианогидроксикоричная кислота (CHCA) (Bruker Daltonics, Germany).

Снятие масс-спектров экстрактов клеток *Y. pestis* проводили с использованием масс-спектрометра Microflex LT «Bruker Daltonics». Образцы в объеме 1 мкл наносили на поверхность 96-луночного MSP планшета и после полного высыхания на каждый

Штаммы *Yersinia pestis*, использованные в работе

Природный очаг	Подвид <i>Y. pestis</i>	Штаммы	Период выделения
Центрально-Кавказский высокогорный (01)	<i>Y. pestis pestis</i>	C-284, C-303, C-318, C-340, C-341, C-506, C-719, C-771, C-778, C-822	1971-2007
Дагестанский равнинно-предгорный (03)	<i>Y. pestis pestis</i>	C-13, C-14, C-16, C-327, C-328, C-551, C-742, C-754, C-791, C-792	1951-2003
Прикаспийский песчаный (43)	<i>Y. pestis pestis</i>	C-144, C-484, C-528, C-653, C-692, C-702, C-705, C-718, C-752, C-789	1966-2003
Восточно-Кавказский высокогорный (39)	<i>Y. pestis caucasica</i>	C-371, C-373, C-496, C-498, C-542, C-672, C-673, C-740, C-826, C-830	1978-2012
Терско-Сунженский низкогорный (02)	<i>Y. pestis pestis</i> <i>Y. pestis caucasica</i>	C-11, C-12, C-281, C-376	1950-1978
Закавказский равнинно-предгорный (08-13)	<i>Y. pestis pestis</i>	C-224, C-231, C-527	1968-1984
Закавказский высокогорный (04-06)	<i>Y. pestis caucasica</i>	C-232, C-273, C-343	1968-1976

образец наслаивали равный объем матрицы — насыщенной α -гидроксикоричной кислоты (CHCA). Насыщенный раствор CHCA готовили в объеме 1 мл: смешивали 475 мкл ультрачистой деионизованной воды, 25 мкл 100% TFA и 500 мкл ацетонитрила и в раствор вносили 0,05 г α -циано-4-гидроксикоричной кислоты. Измерение проводили в линейном режиме с ускоряющей мощностью 20 kV (источник ионов 1) и 18,7 kV (источник ионов 2). Способ ионизации — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с линейным режимом положительных ионов. Напряжение на фокусирующей линзе 9 kV. Время задержки анализатора 150 нсек., частота лазера — 60 Гц. Масс-спектры получали в диапазоне 2000-20000 Да, но основная масса пиков регистрировалась в диапазоне 2500-10000 Да. В качестве калибранта использовали Bacterial Test Standart (Bruker Daltonics). Каждый образец наносили в 8 повторах. Бактериальный стандарт наносили в 5 повторах на одну мишень.

Нами были подобраны параметры получения референсных масс-спектров штаммов *Y. pestis*: количество суммарных спектров — 40, количество спектров для создания библиотеки MSP — 20, мощность лазера — 30-40 %. Спектры каждого штамма обрабатывали и анализировали в программе «FlexAnalysis». Полученные масс-спектры накапливали и собирали в индивидуальный суперспектр данного штамма. Создание суперспектра проводили из 20 единичных масс-спектров в программе MALDI Biotyper v. 3.0. по стандартному алгоритму.

Штаммы *Y. pestis* выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) в течение 24 ч при 28° С. Пробы ДНК штаммов микроба чумы готовили следующим образом: к исследуемому образцу добавляли мертиолат натрия до конечной концентрации 0,01 % и прогревали в микротермостате 30 мин. при 56° С. Далее 100 мкл образца переносили в 1,5 мл пробирки содержащие 300 мкл 6М гуанидинизотиоционата и прогревали 15 мин. при 65° С. Выделение ДНК проводили набором «РИБО-преп» («Интерлабсервис»).

Для проверки кластеризации спектров штаммов *Y. pestis*, относящихся к разным подвидам на MSP-дендограмме, параллельно было проведено генотипирование исследованных штаммов по системе, включающей 25 переменных хромосомных локусов [10, 11]. В состав реакционной смеси входили следующие компоненты: 200 μ м каждого dNTP, 1 U Tag ДНК полимеразы (Интерлабсервис), по 7,5 пмоль каждого праймера, 2,5 mM MgCl₂, 5 мкл Ч5 ПЦР-буфера (Интерлабсервис). Общий объем реакционной смеси составлял 15 мкл, объем вносимой ДНК-матрицы — 10 мкл. Амплификацию проводили по программам, описанным в [10, 11] в термоциклере CFX Duo Fast 48/48 (Bio-Rad). Определение размера фрагментов продуктов амплификации проводили с использованием автоматического анализатора Experion (Bio-Rad) и набора реагентов DNA 1K analysis Kit (Bio-Rad). Определение плазмидного профиля штаммов *Y. pestis* проводили, как описано ранее [15].

Для представления эволюционных отношений между исследованными штаммами *Y. pestis* использовали программу START2 (www.pubmlst.org). При построении дендограммы в программе START2 использован алгоритм UPGMA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создана база масс-спектров 50 штаммов *Y. pestis* подвигов *pestis* и *caucasica*, выделенных на территории природных очагов чумы Северного Кавказа и Закавказья, предназначенная для проведения идентификации культур возбудителя чумы на базе программного обеспечения MALDI Biotyper v3.0, которая позволяет достоверно идентифицировать культуры чумного микроба с SV \geq 2,3-2,4 и дифференцировать их от культур близкородственных видов (*Y. pseudotuberculosis*).

С целью анализа качества полученных масс-спектров и возможности сопоставления собственных данных с результатами других исследователей проанализированы пик-листы всех изученных штаммов *Y. pestis*. Для каждого штамма выбраны сигналы с уровнем сигнал/шум \geq 10%. В результате идентифицированы пики, характерные, по описанию [8],

для разных уровней таксономической идентификации: семейство Enterobacteriaceae, род *Yersinia*, группа *Y. pestis/pseudotuberculosis*, вида *Y. pestis*, что свидетельствует о валидности используемых образцов и достоверности полученных результатов. Отсутствие одного из специфических пиков в единичных спектрах не оказывает, на наш взгляд существенного влияния на результаты. Ни для одного из образцов не было выявлено отсутствие сигнала более чем по одному биомаркеру (пику). Большинство этих маркеров относятся к фрагментам рибосомальных (50S и 30S) и структурных белков [8].

Показано, что использование MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа для идентификации культур возбудителя чумы позволяет не только проводить видовую идентификацию, но и дифференцировать штаммы основного подвида — *Y. pestis pestis* и подвида *Y. pestis caucasica*. При анализе пик-листов и масс-спектров у большинства штаммов идентифицирован пик 3065 Да, который ранее был описан как видоспецифичный для штаммов *Y. pestis* [8]. Данный пик — это пептид размером 30 аа, который идентифицируется в базе данных UniprotKB как фрагмент белка активатора плазминогена, локализованного на плазмиде пестициногенности pPla (pPst). Высокая интенсивность специфического пика 3065 Да, обусловлена тем, что ген *pla*, кодирующий синтез белка-активатора плазминогена, является мульткопийным. Как показали наши исследования, данный дифференцирующий маркер характерен только для штаммов *Y. pestis* основного подвида, вне зависимости от биовара, имеющих плазмиду pPla (pPst). Штаммы неосновного подвида, *Y. pestis caucasica*, не имеют пика 3065 Да, как и плазмиды pPla (pPst), что подтверждается результатами молекулярно-генетических исследований.

Исследованные штаммы неосновного подвида, *Y. pestis caucasica* не имеющие плазмиды пестициногенности, при идентификации в программе MALDI Biotyper с использованием базы данных Biotyper и собственной базы масс-спектров чумного микроба, циркулирующих на территории Северного Кавказа, тем не менее, идентифицируются как штаммы *Y. pestis* и дифференцируются от штаммов *Y. pseudotuberculosis* с получением высоких значений коэффициента достоверности (Score). Проведенный анализ с использованием программного обеспечения Biotyper и FlexAnalysis показал, что основой такой дифференциации служат минорные пики, а также соотношение интенсивности родо- и группоспецифических пиков, представленных на спектре.

Интересным является отсутствие видоспецифического пика 3065 Да у трех штаммов основного подвида чумного микроба (*Y. pestis* C-231, C-702, C-822), что коррелирует с данными молекулярно-генетического анализа об отсутствии у этих штаммов плазмиды pPST1. Тем не менее, по своим биохимическим, генетическим и биологическим свойствам эти штаммы относятся к типичным представителям основного подвида, что также отчетливо видно из MSP и MLVA 25 -дендрограммы. Пик 3065 Да, указывающий на выработку штаммом белка-активатора плазминогена, обнаружен у 33 из 36 штаммов чумного микроба основного подвида и не идентифицирован ни у одного штамма кавказского подвида, что совпадает с результатами генетического скрининга на наличие плазмид и биохимическими свойствами изученных штаммов. У всех штаммов кавказского подвида мы обнаружили пик 6474 Да, который в работе [8] описан как видоспецифический для *Y. pseudotuberculosis*. На наш взгляд, это служит косвенным подтверждением того, что штаммы кавказского подвида, наряду со штаммами линии 0.PE7 из Китая являются наиболее древними штаммами *Y. pestis* [1, 6], которые наиболее близко стоят к исходной предковой форме — *Y. pseudotuberculosis*.

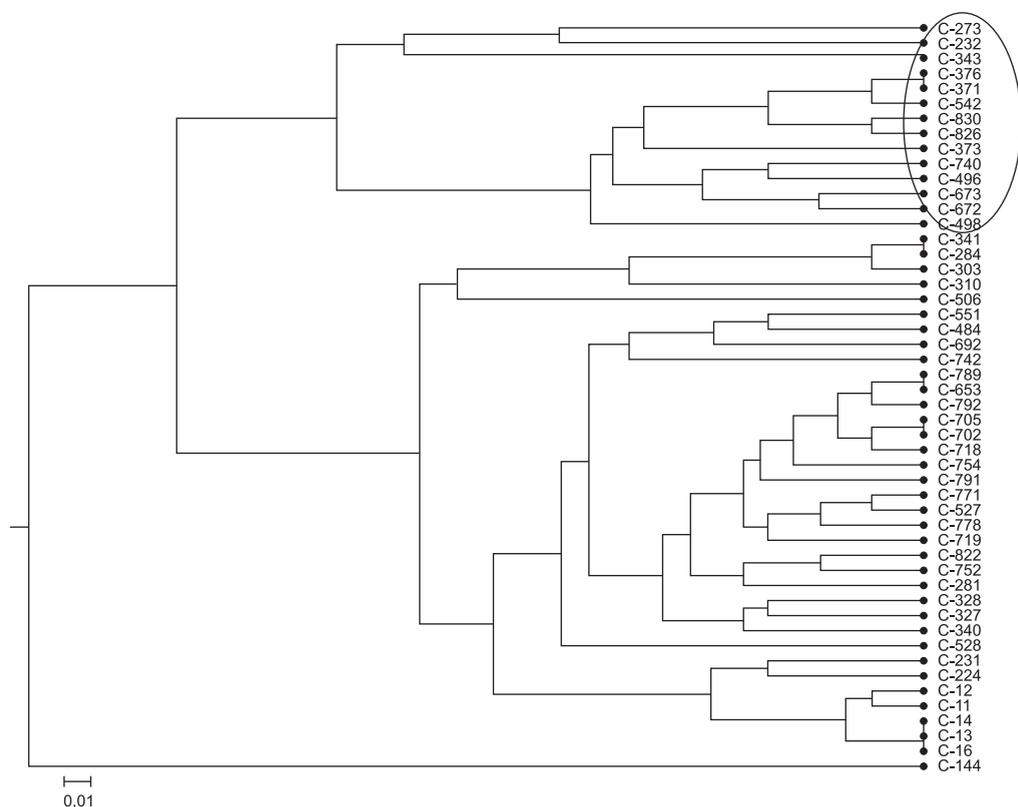
Как показывает анализ MSP-дендрограммы штаммов *Y. pestis*, в структуре дендрограммы четко выделяются 3 основные ветви. Первая ветвь (нижняя), более многочисленная и структурированная, представлена штаммами основного подвида *Y. pestis pestis* которая имеет прикорневое деление на 2 основные ветви и далее делится на ветви более мелкого порядка, что зависит, в основном, от интенсивности пиков (соотношения m/z). Кластеризация штаммов не зависит от принадлежности к определенному природному очагу, что объясняется отсутствием специфичес-

ких биохимических или фенотипических признаков, характерных для штаммов из конкретных очагов. Исключение составляют штаммы, выделяемые на территории Восточно-Кавказского высокогорного (39) и Закавказского высокогорного (04-06) природных очагов чумы. Эти штаммы относятся к неосновному подвиду *Y. pestis saucasica* и формируют на MSP-дендрограмме две верхние прикорневые ветви. Четкое деление штаммов на 4 основные группы на основе кластеризации их MSP дендрограмм дает основание предположить, что такое деление связано с наличием или отсутствием определенных биохимических признаков, однако на основании данных основных биохимических тестов (ферментация сахаров, денитрификация, уреазная, фибринолитическая и коагулазная активность, аутокотрофность по некоторым аминокислотам) такую связь выявить не удалось.

Деление на две основные ветви, соответствующее делению на основной и неосновной подвиды чумного микроба, происходит на основании наличия специфического белкового пика с молекулярной массой 3065 Да высокой степени интенсивности у штаммов *Y. pestis pestis*. Кроме того, масс-спектры основного и неосновного подвидов *Y. pestis* различаются по интенсивности ряда пиков в детектируемом диапазоне масс 2-20 кДа.

Достоверность дискриминации штаммов чумного микроба до уровня подвида подтверждена кластерным анализом с использованием метода главных компонент.

Для проверки качества полученных спектров и построенной на их основе MSP-дендрограммы штаммов *Y. pestis* параллельно было проведено генотипирование исследованных штаммов по MLVA системе, включающей 25 переменных хромосомных локусов [1, 6]. Дендрограмма, представленная на рис., построена по результатам генетического типирования MLVA-25.



Филогенетические взаимоотношения штаммов *Y. pestis*, дендрограмма построена с использованием алгоритма UPGMA.

Как видно из представленной дендрограммы, в целом топология данного дерева повторяет топологию дерева, построенного на основе MS-спектров, сохраняя прикорневое деление на две основные ветви, соответствующие основному и неосновному подвидам чумного микроба.

Таким образом, используя UPGMA алгоритм определения филогенетического родства штаммов микроорганизмов, нам удалось подтвердить высокую дифференцирующую способность полученных MS-спектров и возможность их использования при создании базы данных масс-спектров штаммов *Y. pestis*, циркулирующих на территории Северного Кавказа и Закавказья.

База данных масс-спектров типичных и атипичных штаммов *Y. pestis*, выделенных из природных очагов чумы Северного Кавказа и Закавказья, зарегистрирована в Федеральной службе по интеллектуальной собственности (свидетельство о гос. регистрации базы данных № 2017620225)

На основании масс-спектрометрической характеристики исследуемой выборки проведена дифференциация штаммов *Y. pestis* подвида *pestis* от штаммов подвида *caucasica*. Согласно полученным данным, масс-спектры штаммов *Y. pestis* подвида *caucasica*, циркулирующие на территориях Восточно-Кавказского высокогорного и Закавказского высокогорного природных очагов, имеют высокую степень сходства между собой. Они отличаются от штаммов *Y. pestis* подвида *pestis*, циркулирующих на территориях Центрально-Кавказского высокогорного, Дагестанского равнинно-предгорного и Прикаспийского песчаного природных очагов чумы. Главным отличием, позволяющим даже визуальным образом на масс-спектре дифференцировать штаммы основного и кавказского подвидов, является наличие пика 3065 Да, который, являясь фрагментом белка-активатора плазминогена, указывает на наличие у штамма основных факторов вирулентности, характерных для подвида *Y. pestis pestis*. То, что у штаммов кавказского подвида имеется пик 6474 Да, ранее описанный как характерный для *Y. pseudotuberculosis*, на наш взгляд, косвенно подтверждает теорию о происхождении вида *Y. pestis* от возбудителя псевдотуберкулеза и более древнем происхождении штаммов кавказского подвида по сравнению с основным, что совпадает с результатами WGS-анализа, описанными ранее [1, 6].

Простота и скорость пробоподготовки и выполнения анализа, низкая стоимость расходных материалов позволяют рассматривать метод MALDI-TOF масс-спектрометрической идентификации как перспективный в лабораторной диагностике возбудителя чумы и его дифференциации на подвиды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Носов Н.Ю., Куклева Л.М., Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Кутырев В.В. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования штаммов из России и сопредельных государств. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 4: 58-64.
2. Попов Н.В., Безмертный В.Е., Матросов А.Н., Князева Т.В., Кузнецов А.А., Федоров Ю.М., Попов В.П., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М., Косилко С.А., Чипанин Е.В., Дубянский В.М., Малецкая О.В., Григорьев М.П., Зенкевич Е.С., Топорков В.П., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 1: 13-19.
3. МУ 4.2.2940-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней». М., 2011.
4. СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». М., 2013.
5. Clark A., Kaleta E. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013, 3: 547-603.
6. Cui Y., Yu C., Yan Y. et al. Historical variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013, 110(2): 577-582.

7. Lasch P., Nattermann H., Elchard M. et al. MALDI-TOF mass-spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. *Analytical chemistry*. 2008, 80: 2026-2034.
8. Lasch P., Drevinek M., Nattermann H. et al. Characterization of Yersinia using MALDI-TOF mass-spectrometry and chemometrics. *Analytical chemistry*. 2010, 82: 206 -210.
9. Lasch P., Grunow R., Antonation K. et al. Inactivation techniques for MALDI-TOF MS analysis of highly pathogenic bacteria — A critical review. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016, 1: 13-15
10. Le Flèche P., Hauck Y., L. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of Yersinia pestis and Bacillus anthracis. *BMC Microbiology*. 2001, 1: 23-34.
11. Li I., Cui Y., Hauck Y. et al. Genotyping and Phylogenetic Analysis of Yersinia pestis by MLVA: Insights into the Worldwide Expansion of Central Asia Plague Foci. *PLoS ONE*. 2009, 4: 45-53.
12. Panda A. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. *Journal of microbiological methods*. 2015, 109: 93-105.
13. Salman M.D., Steneroden K. Important Public Health Zoonoses through cattle. *Zoonoses-Infections affecting humans and animals*. Springer Netherlands. 2015, 1: 3-22.
14. Van Veen S.Q., Claas E.C.J., Kuijper E.J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 3: 900-907.
15. Woron A.M., Nazarian E.J., Egan C. et al. Development and evaluation of a 4-target multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and characterization of Yersinia pestis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2006, 56: 261—268.

Поступила 11.03.19

Контактная информация: Котенева Елена Анатольевна, к.б.н.,
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

С.В.Балахонов, В.И.Дубровина, В.В.Войткова, К.М.Корытов, Н.Л.Баранникова, В.Б.Николаев, Т.Т.Шкаруба

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛЕТОК КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ТЕРМОЭКСТРАКТАМИ BRUCELLA ABORTUS

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Изучить субпопуляционный состав клеток крови экспериментальных животных, привитых термоэкстрактами (ТЭ) *Brucella abortus* в L- или S-форме. *Материалы и методы.* 100 сертифицированных (НПО «Вектор», Новосибирск) беспородных мышей иммунизировали ТЭ *B. abortus* И-206 в L- или S-форме в дозе 20 мкг по белку. Животных выводили из эксперимента на 1, 3, 7, 14 и 21 сутки наблюдения и определяли фенотип (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD69) клеток крови. *Результаты.* Выявлены общие закономерности при введении исследуемых препаратов. Так, ТЭ *B. abortus* в L- и S-форме приводят к формированию иммунного ответа, который проявляется увеличением содержания гранулоцитов и экспрессии CD69 Т- и В-лимфоцитами крови на ранние сроки наблюдения (1-3 сутки), снижением общего содержания В-лимфоцитов на поздние сроки наблюдения (7-21 сутки). При этом, у мышей, получивших ТЭ *B. abortus* в L-форме, показатели экспрессии CD69 субпопуляций лимфоцитов крови были достоверно выше, чем у мышей, получивших ТЭ *B. abortus* в S-форме. Выявлены различия в формировании гуморального иммунного ответа, что, возможно, связано с изменением химического состава бруцелл в процессе L-трансформации. *Заключение.* В ходе исследования установлено, что термоэкстракты *B. abortus* в L- или S-форме приводят к иммунологической перестройке организма экспериментальных животных. На основании полученных данных существует необходимость дальнейшего детального исследования иммуногенных свойств ТЭ *B. abortus* в L- или S-форме.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 25—31

Ключевые слова: *Brucella abortus*, термоэкстракт, экспериментальные животные, кровь, проточная цитометрия