

ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНОГО АНТИГЕННОГО МЕЛИОИДОЗНОГО ДИАГНОСТИКУМА ПРИ АНАЛИЗЕ ПРОБ СЫВОРОТОК ОТ ЛИЦ ИЗ ЭНДЕМИЧНЫХ ПО МЕЛИОИДОЗУ ПРОВИНЦИЙ ХА ЗАНГ, ЛАНГШОН И КУАНГНИНЬ СОЦИАЛИСТИЧЕСКОЙ РЕСПУБЛИКИ ВЬЕТНАМ



Д.Л. Терешко¹, И.В. Новицкая¹, И.Б. Захарова¹, Чиен Д.², А.Н. Кузнецов²,
М.Я. Кулаков¹, А.А. Будченко¹, В.Г. Пушкар¹, Д.В. Виктор¹, А.В. Топорков¹

¹ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Волгоград, Россия

² Совместный Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, г. Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам

Резюме. Мелиоидоз — особо опасная инфекция с эндемичным распространением, вызванная грамотрицательным микроорганизмом II группы патогенности *Burkholderia pseudomallei*. В эндемичных странах мелиоидоз занимает одно из ведущих мест по летальности после ВИЧ, туберкулеза и — в последние годы — COVID-19. Естественные экологические ниши возбудителя находятся в зонах тропического и субтропического климата, прежде всего в Юго-Восточной Азии и Австралии, где во влажной почве и воде в определенном температурном диапазоне окружающей среды поддерживается его существование как вида. Однако в настоящее время все более часто случаи мелиоидоза регистрируют вне эндемичных территорий, что подчеркивает актуальность совершенствования средств и методов лабораторной диагностики этой болезни как для государств, расположенных в зоне природных очагов, так и для стран в случае завоза на их территорию этой малоизвестной для местного здравоохранения инфекции. В таких странах, включая РФ, население не имеет естественного иммунитета к возбудителю, в связи с чем эта инфекция приобретает еще большую клиническую и эпидемиологическую значимость. В Волгоградском научно-исследовательском противочумном институте сконструирован эритроцитарный антигенный мелиоидозный диагностикум для РНГА, позволяющий выявлять присутствие мелиоидозных антител в сыворотках крови. Препарат получен на основе биологического носителя — эритроцитов барана, сенсибилизированных выделенными белковыми антигенными комплексами *B. pseudomallei*. Высокие аналитические характеристики диагностикума были подтверждены на моде-

Адрес для переписки:

Терешко Дмитрий Леонидович
400131, Россия, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7,
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (8442) 37-37-74; 8 937 082-93-11 (моб.).
E-mail: dltereshko@gmail.com

Contacts:

Dmitrii L. Tereshko
400131, Russian Federation, Volgograd, Golubinskaya str., 7,
Volgograd Plague Control Research Institute.
Phone: +7 (8442) 37-37-74; +7 937 082-93-11 (mobile).
E-mail: dltereshko@gmail.com

Для цитирования:

Терешко Д.Л., Новицкая И.В., Захарова И.Б., Чиен Д., Кузнецов А.Н.,
Кулаков М.Я., Будченко А.А., Пушкар В.Г., Виктор Д.В., Топорков А.В.
Получение и использование эритроцитарного антигенного
мелиоидозного диагностикума при анализе проб сывороток от лиц
из эндемичных по мелиоидозу провинций Ха Занг, Лангшон и Куангнинь
Социалистической Республики Вьетнам // Инфекция и иммунитет.
2022. Т. 12, № 5. С. 919–928. doi: 10.15789/2220-7619-OAU-1933

Citation:

Tereshko D.L., Novitskaya I.V., Zakharova I.B., Trien D., Kuznetsov A.N.,
Kulakov M.Ya., Budchenko A.A., Pushkar V.G., Viktorov D.V., Toporkov A.V.
Obtaining and using erythrocyte antigenic melioidosis diagnostic agent in the
analysis of serum samples from melioidosis-endemic provinces Ha Giang,
Lang Son and Quang Ninh of the Socialist Republic of Vietnam // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12,
no. 5, pp. 919–928. doi: 10.15789/2220-7619-OAU-1933

лях сывороток иммунизированных и переболевших экспериментальных животных. С помощью полученного набора реагентов проведено изучение уровня антител к возбудителю мелиоидоза в образцах сывороток крови жителей 3-х провинций Вьетнама (Ха Занг, Лангшон и Куангнинь), а также — в качестве контрольной группы — жителей Волгоградской области. В пробах, полученных из неэндемичного региона, не более чем в 25% случаях были зарегистрированы титры РНГА, не превышающие разведение 1:10, что обусловлено, по-видимому, кросс-реактивностью сывороточных иммуноглобулинов. Положительные пробы в образцах сывороток клинически здоровых жителей провинций Ха Занг, Лангшон и Куангнинь в титре 1:10 выявлены в 71,5%, в разведениях 1:20—1:80 — в 28,5% наблюдений. С нашей точки зрения, диагностическую значимость, отражающую напряженность противомелиоидозного иммунитета населения, имеет установленный в РНГА титр сывороточных антител 1:80.

Ключевые слова: мелиоидоз, *Burkholderia pseudomallei*, иммунодиагностика, популяционный иммунитет, РНГА, антигенный эритроцитарный диагностикум, Социалистическая Республика Вьетнам.

OBTAINING AND USING ERYTHROCYTE ANTIGENIC MELIIDOSIS DIAGNOSTIC AGENT IN THE ANALYSIS OF SERUM SAMPLES FROM MELIIDOSIS-ENDEMIC PROVINCES HA GIANG, LANG SON AND QUANG NINH OF THE SOCIALIST REPUBLIC OF VIETNAM

Tereshko D.L.^a, Novitskaya I.V.^a, Zakharova I.B.^a, Trien D.^b, Kuznetsov A.N.^b, Kulakov M.Ya.^a, Budchenko A.A.^a, Pushkar V.G.^a, Viktorov D.V.^a, Toporkov A.V.^a

^a *Volgograd Plague Control Research Institute, Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Volgograd, Russian Federation*

^b *Joint Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center, Hanoi, Socialist Republic of Vietnam*

Abstract. Melioidosis is a particularly dangerous infection with endemic distribution caused by the Gram-negative microorganism from the pathogenicity group II *Burkholderia pseudomallei*. In endemic countries, melioidosis holds one of the leading places in mortality rate after HIV, tuberculosis and, in recent years, COVID-19. The natural ecological pathogen niches are located in tropical and subtropical climate zones, primarily in Southeast Asia and Australia, where its existence as a species is maintained in moist soil and water in a certain temperature environmental range. However, at present, more and more often cases of melioidosis are registered outside endemic territories, which emphasizes the relevance of improving the means and methods of laboratory diagnostics of this disease both for countries located in the zone of natural foci as well as for local healthcare of the countries after importation of this poorly known infection into their territory. In such countries, including the Russian Federation, the population has no natural immunity to the pathogen, and therefore this infection acquires even greater clinical and epidemiological significance. In the Volgograd Plague Control Research Institute, an erythrocyte antigenic melioidosis diagnostic agent for IHA was designed allowing to detect the presence of serum melioidosis antibodies. The diagnostic agent was obtained on the basis of a biological carrier — ram erythrocytes sensitized with isolated protein antigenic complexes of *B. pseudomallei*. The high analytical characteristics of the diagnostic agent were confirmed on sera models of immunized and recovering experimental animals. Using the obtained set of reagents, the level of serum antibodies against the causative agent of melioidosis was studied in residents from the 3 provinces of Vietnam (Ha Giang, Lang Son and Quang Ninh), as well as in control group composed of residents of the Volgograd region. In samples obtained from a non-endemic region, not more than 25% of cases contained IHA titers at lower than 1:10 dilution, which is apparently due to cross-reactivity of serum immunoglobulins. Positive serum samples from clinically healthy residents of Ha Giang, Lang Son and Quang Ninh provinces were at a titer of 1:10 detected in 71.5%, in dilutions of 1:20—1:80 — in 28.5% of cases. Thus, we believe that serum antibody titer of 1:80 established in the IHA results, has a diagnostic significance, reflecting the intensity of the anti-melioidosis populational immunity.

Key words: melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, immunodiagnostics, population immunity, IHA, erythrocyte antigenic diagnostic agent, Socialist Republic of Vietnam.

Введение

Эндемичные инфекции занимают особое место в структуре общей заболеваемости, так как их распространение тесно связано с персистенцией возбудителей в определенных зонах и поддержанием там природных очагов, представляющих для населения планеты постоянную эпидемиологическую опасность.

Мелиоидоз (болезнь Уитмора, пневмоэнтерит и др.) — особо опасная инфекция, границы эндемичности которой, согласно последним данным,

охватывают зону между 30-ми параллелями северной и южной широт всех континентов [1]. Традиционно мелиоидоз считают заболеванием, наиболее характерным для стран Южной и Юго-Восточной Азии, в частности, Вьетнама, что, по-видимому, обусловлено особенностями географического положения этой местности, главная из которых — рекордно длинная (более 3,5 тыс. км) узкая береговая линия, что оказывает мощнейшее влияние на климат страны, подверженной действию муссонов, цунами, наводнений и других природных катаклизмов, сопровождаю-

щихся обилием осадков и грязевых потоков. С учетом широт, в границах которых расположен Вьетнам, высокая влажность и среднегодовой температурный диапазон от +26 до +33°C представляют собой основные факторы, формирующие климатические условия этого региона. Не случайно другие названия мелиоидоза — «Вьетнамская лихорадка» и «Вьетнамская часовая бомба замедленного действия». Известно, что у участников войны во Вьетнаме мелиоидоз мог проявиться даже спустя десятилетия после возвращения из эндемичного региона [10].

Как правило (до 85% случаев) при мелиоидозе наблюдают острое начало, нередко с септикопиемией [18], которая без своевременного этиотропного лечения часто заканчивается фатально. Пик заболеваемости отмечают в период дождей [14], преимущественно среди фермеров и сельских жителей, возделывающих рис [6, 12], что подтверждает основную роль контактного пути передачи инфекции [11]. Однако иные пути возможного инфицирования — алиментарный, ингаляционный, половой — не исключают случаев заболевания и среди других категорий населения.

Возбудителем мелиоидоза является *Burkholderia pseudomallei* — микроорганизм II группы патогенности, характеризующийся чрезвычайно высоким уровнем генетически детерминированной резистентности к антибиотикам и обладающий способностью в течение длительного времени персистировать в макроорганизме, избегая уничтожения системой иммунитета [1].

В природных условиях *B. pseudomallei* формирует естественные ниши в глубоких слоях влажных почв, насыщенных грунтовыми водами, где, наряду с другими родственными почвенными буркхольдериями, такими как *B. cepacia* и *B. thailandensis*, входит в состав биоценоза тропического и субтропического пояса [15, 17].

Следует отметить, что ранее считавшийся сапрофитическим вид *B. thailandensis* так же, как и *B. pseudomallei*, способен вызывать тяжелую инфекцию с септическими проявлениями, особенно у больных с нарушением иммунного статуса [13].

Возможные многообразные контакты людей, проживающих в эндемичном регионе, с широко представленными в окружающей среде буркхольдериями приводят к формированию у населения естественной иммунной прослойки, то есть популяционного иммунитета, обусловленного накоплением в сыворотках специфических иммуноглобулинов. В ряде случаев это может происходить без манифестации инфекции. И действительно, работами зарубежных авторов показана потенциальная возможность обнаружения мелиоидозных антител в сыворотках крови здоровых лиц [7]. Однако при этом авторы рекомендуют учитывать случаи возможных положительных реакций сывороточных антител, обусловленных перекрестной реактивностью *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* [10].

В целом, уровень сывороточных иммуноглобулинов может служить относительным показателем как распространенности возбудителя в эндемичной зоне, так и его контагиозности.

Для выявления антител в сыворотках применяют различные методы иммуноанализа, одним из которых, включенным в принятые в Российской Федерации схемы экспресс-диагностики мелиоидоза (МУ 4.2.2787-10), является реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). РНГА представляет собой один из наиболее доступных и простых методов иммуноанализа, позволяющих в течение нескольких часов без использования специального оборудования получить точные, воспроизводимые и хорошо визуализируемые данные.

В зависимости от используемого препарата с помощью РНГА осуществляют выявление в исследуемых образцах либо антигенов, либо антител. В последнем случае РНГА позволяет провести оценку состояния естественного популяционного иммунитета у населения, проживающего в эндемичном регионе, в частности, в провинциях Ха Занг, Ланшон и Куангнинь Социалистической Республики Вьетнам.

В рамках работы, проводимой Совместным Российско-Вьетнамским Тропическим научным-исследовательским и технологическим центром, нами поставлена цель разработать эритроцитарный антигенный мелиоидозный диагностикум и определить возможность его использования для выявления мелиоидозных антител с помощью РНГА при изучении образцов сывороток населения отдельных провинций Вьетнама как зоны эндемичного распространения *B. pseudomallei*.

Материалы и методы

В качестве биологической основы диагностикума для РНГА использовали эритроциты, полученные из дефибринированной крови барана и суспендированные в 0,15 М растворе NaCl до концентрации по объему 8%. Эритроциты были формализированы (3% формалин в соотношении 1:1, 37°C, 20 ч при постоянном перемешивании), танизированы (танин 1:40 000, соотношение 1:1, 37°C, 15 мин), после чего отмыты путем центрифугирования (1500 об/мин, 3-кратно по 15 мин) и подвергнуты прогреванию (45°C, 30 мин).

Антигенный комплекс, предназначенный для сенсибилизации эритроцитов, получали из ацетовысушенных и дезинтегрированных («Artek sonic dismembrator model 150», 100 Вт, 20 кГц — 1 мин, 5х, на льду) клеток штамма *B. pseudomallei* 107, представленного в лаборатории Коллекционных штаммов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. После центрифугирования взвеси клеток (6000 об/мин — 25 мин)

к надосадку добавляли 1:1 насыщенный раствор сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и оставляли для высаливания (18 ч, 4°C). Осадок отделяли центрифугированием (6000 об/мин — 25 мин), ресуспендировали в 0,15 М растворе NaCl, очищали от солей путем диализа, концентрировали, изучали методом электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия (Laemmli U.K., 1970), после чего использовали в работе. Содержание белка в препарате определяли спектрофотометрически (NanoPhotometer P 300, Implen, Германия) по отношению к стандартному 1% раствору БСА при длине волны 280 нм. Подбор дозы сенсицина проводили в диапазоне концентраций 250–1500 мкг/мл.

Сенсибилизацию эритроцитов полученным антигенным комплексом осуществляли в соответствии с его оптимальной сенсибилизирующей дозой [5].

Готовый препарат разливали в ампулы по 1 мл, замораживали до -70°C , затем подвергали лиофилизации в протективной среде (1% НКС, 15% реополиглобулина, 7,5% сахарозы в дистиллированной воде) по 10-ступенчатой программе, в ходе которой в течение 24 ч и более снижение вакуума от 0,3 до 0,1 (ГПа) сопровождалось плавным подъемом температуры полка десублиматора от -70°C до комнатной температуры [4]. После окончания процесса высушивания ампулы запаивали и вскрывали непосредственно перед началом исследования, добавляя к лиофилизату 1 мл 0,15 М хлорида натрия, содержащего с целью стабилизации препарата формалин в конечной концентрации 1%.

Изучение аналитических характеристик диагностикума до и после его высушивания проводили на моделях гомо- и гетерологичных гипериммунных сывороток, сывороток экспериментально зараженных животных, а также образцов сывороток человека из произвольной выборки лиц, проживающих на эндемичных территориях трех провинций Вьетнама (Ха Занг, Лангшон, Куангнинь) и вне их.

Все образцы сывороток для исследования в РНГА с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом были любезно предоставлены сотрудниками Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра под кодовыми наименованиями согласно Хельсинкской декларации [2, 3]. Сыворотки были разделены на аликвоты и зарезервированы в хранилище при температуре -70°C .

Выполнение РНГА осуществляли в микроварианте. Сыворотки инактивировали при 56°C , разводили 1:10 в 0,15 М NaCl и титровали двойным шагом в объеме 50 мкл в 1% нормальной кроличьей сыворотке (НКС), содержащей 1% формалина, в полистироловой 96-луночной пластине с V-образным дном, после чего в каждую лунку вносили по 25 мкл 2,5% диагностикума,

и пластину оставляли при комнатной температуре под крышкой. Отрицательными контролями служили лунки с добавлением интактной 1% НКС. Учет реакции осуществляли по 4-крестовой системе: предварительно через 2 ч и окончательно — спустя 24 ч после постановки.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel. Границы доверительного интервала (95% CI) рассчитывали по методу Уилсона (Wilson).

Результаты

Антигенный комплекс возбудителя мелиоидоза, осажденный с помощью насыщенного до 40% раствора сульфата аммония и ресуспендированный до концентрации 10 мг белка/мл, был использован для сенсибилизации обработанных танином и формалином эритроцитов. В состав сенсицина входили 4 мажорных протеина — 28, 29, 40, 51,2 kDa.

Оптимальная сенсибилизирующая доза, при которой нагрузка сенсицина обеспечивала получение образцов диагностикума с чувствительностью не ниже 1:1280 с контрольной гипериммунной козьей сывороткой, составила 250 мкг/мл, что послужило основанием для использования в ходе конструирования опытной серии препарата концентрации сенсицина 500 мкг/мл (двойной сенсибилизирующей дозы).

Аналитические характеристики полученного диагностикума были изучены на наборах гомо- и гетерологичных гипериммунных сывороток, а также сывороток зараженных различными штаммами возбудителей особо опасных инфекций экспериментальных животных (табл. 1).

Как следует из данных таблицы, нами был получен препарат эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума, продемонстрировавший на моделях иммунных и переболевших чувствительности и специфичности, которые в полной мере в эксперименте обеспечивали выявление специфических антител к *B. pseudomallei*.

Для определения фоновых показателей возможных перекрестно реагирующих антител у населения Российской Федерации были изучены в РНГА образцы 36 интактных сывороток человека (жителей г. Волгограда) при их титровании двукратным шагом с начального разведения 1:5.

Итоги РНГА, отражающие взаимодействие антигенов возбудителя мелиоидоза с антителами, присутствовавшими в образцах интактных сывороток человека, представлены в табл. 2.

Как следует из представленных данных, на модели образцов сывороток, полученных из неэндемичного региона, положительные результаты РНГА в титре проб 1:5 обнаружены в 14 (38,9%), 1:10 — в 9 (25%) наблюдениях. В 13 слу-

чаях из 36 (36,1%) антител, перекрестно реагирующих с возбудителем мелиоидоза, не было зарегистрировано ни в одном из изученных разведений, то есть все 36 образцов сывороток, принадлежащих жителям неэндемичной зоны, в титрах от 1:20 и выше оказались отрицательными.

В рамках работы, проводимой совместно с Российско-Вьетнамским Тропическим научно-исследовательским и технологическим центром, нами проведено тестирование в РНГА

550 образцов сывороток крови лиц, проживающих во вьетнамских провинциях Ха Занг, Лангшон, Куангнинь (290, 195 и 65 проб соответственно) в возрасте от 18 до 81 года (Me = 41, IQR 30–50), у которых отсутствовали клинические признаки мелиоидозной инфекции.

Изучение некоторых демографических показателей (пол, возраст) было выполнено с использованием проб сывороток, полученных из провинции Ха Занг. Выборка в равной мере

Таблица 1. Аналитические характеристики эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума по результатам РНГА с сыворотками экспериментальных животных

Table 1. Analytical characteristics of Erythrocyte Antigenic Melioidosis Diagnostic Agent based on IHA results with experimental animal sera

Вид сыворотки Type of serum	Титры в РНГА IHA titers
Сыворотки кроликов, зараженных <i>B. pseudomallei</i> 107 Serum of rabbits infected with <i>B. pseudomallei</i> 107	1:1280–1:2560
Сыворотки белых мышей, зараженных <i>B. pseudomallei</i> 56830 Sera of white mice infected with <i>B. pseudomallei</i> 56830	1:160– 1:1280
Сыворотки кроликов, иммунизированных различными инактивированными штаммами возбудителей мелиоидоза (<i>B. pseudomallei</i> 56830, 57576, 59361«S» 111-6-1 и др.) Sera of rabbits immunized with various inactivated strains of melioidosis pathogens (<i>B. pseudomallei</i> 56830, 57576, 59361 «S» 111-6-1, etc.)	1:3200–1:25 600
Сыворотка козья гипериммунная мелиоидозная (против <i>B. pseudomallei</i> 100) Goat hyperimmune serum melioidosis (against <i>B. pseudomallei</i> 100)	1:51 200–1:204 800
Сыворотка кролика, иммунизированного авирулентным штаммом <i>B. pseudomallei</i> VPA Sera from rabbits immunized with avirulent strain <i>B. pseudomallei</i> VPA	1:320–1:640
Иммунная сыворотка кролика против <i>B. thailandensis</i> Rabbit immune serum against <i>B. thailandensis</i>	1:400
Иммунная сыворотка кролика против <i>B. cepacia</i> 423 Rabbit immune serum against <i>B. cepacia</i> 423	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>B. cepacia</i> 8235 Rabbit immune serum against <i>B. cepacia</i> 8235	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>B. cepacia</i> 3181 Rabbit immune serum against <i>B. cepacia</i> 3181	1:40
Иммунная сыворотка кролика против <i>B. cepacia</i> 8236 Rabbit immune serum against <i>B. cepacia</i> 8236	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>B. cepacia</i> (ЭЦАг) Rabbit immune serum against <i>B. cepacia</i> (ECAg)	1:20
Иммунная сыворотка кролика против <i>P. aeruginosa</i> H-8 Rabbit immune serum against <i>P. aeruginosa</i> H-8	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>P. aeruginosa</i> H1 Rabbit immune serum against <i>P. aeruginosa</i> H1	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>P. aeruginosa</i> H-6 Rabbit immune serum against <i>P. aeruginosa</i> H-6	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>P. aeruginosa</i> PAO 1 Rabbit immune serum against <i>P. aeruginosa</i> PAO 1	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>P. fluorescens</i> 540 Rabbit immune serum against <i>P. fluorescens</i> 540	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>P. pseudoalcaligenes</i> Rabbit immune serum against <i>P. pseudoalcaligenes</i>	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>F. tularensis</i> 32 Rabbit immune serum against <i>F. tularensis</i> 32	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>F. tularensis</i> Rabbit immune serum against <i>F. tularensis</i>	–
Иммунная сыворотка кролика против <i>Y. pestis</i> Rabbit immune serum against <i>Y. pestis</i>	–

Таблица 2. Результаты РНГА с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом при исследовании сывороток лиц, проживающих вне эндемичного региона

Table 2. IHA results with Erythrocyte Antigenic Melioidosis Diagnostic Agent assessing sera from persons living outside the endemic region

Общее число проб Total number of samples	Из них положительные в РНГА в титрах Of these, IHA positive titers					
	1:5		1:10		1:20	
	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)
36	14	38,9 (24,8–55,1)	9	25 (13,8–41,1)	0	–

охватывала взрослое население (как мужчин, так и женщин) в возрасте от 18 до 81 года (рис. 1).

Таким образом, результаты РНГА с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом при изучении рандомных образцов сывороток жителей Вьетнама из провинций Ха Занг, Лангшон и Куангнинь, потенциально содержащих антитела к возбудителю мелиоидоза, подтвердили возможность использования РНГА для выявления мелиоидозных антител в сыворотках человека (табл. 3).

Согласно полученным результатам, мелиоидозные антитела в изученных образцах сывороток обнаружены в титре проб 1:10 в 71,5% наблюдений, хотя при дальнейшем разведении сывороток количество положительных находок в РНГА резко снижалось и составляло для титров 1:20–1:40–1:80 соответственно 7,8, 6,1 и 14,6% (в целом около 30%).

Результаты реакции иллюстрированы гистограммой (рис. 2).

Таким образом, положительные находки РНГА в титрах сывороток от 1:20 до 1:80 были зарегистрированы в образцах, принадлежащих

жителям каждой из трех изученных провинций Вьетнама, и во всех наблюдениях отсутствовали в пробах, полученных от лиц, проживающих вне эндемичного региона.

Обсуждение

Формализированные танизированные эритроциты способны эффективно адсорбировать на своей поверхности белковые антигенные комплексы и как биологический носитель остаются востребованными компонентами диагностических тест-систем.

Опытные серии препарата, представляющие собой носитель, ковалентно связанный с антигенами возбудителя мелиоидоза, были получены при белковой нагрузке сенсирина 500 мкг/мл.

Аналитические характеристики диагностикума были изучены на моделях более чем 20 образцов сывороток экспериментальных животных (коз, кроликов, белых мышей), подвергавшихся как иммунизации, так и заражению. При этом оказалось, что титры сывороток переболевших мелиоидозом в острой форме лабораторных белых мышей и кроликов составляют в РНГА (в зависимости от вида объекта) от 1:160 до 1:1280.

Уровень мелиоидозных антител в гипериммунных сыворотках, полученных в ходе многократной иммунизации взвесями инактивированных клеток возбудителя здоровых животных (кроликов, коз), может достигать 1:25 000 и даже — при использовании одного из наиболее вирулентных штаммов *B. pseudomallei* 100 — 1:204 800.

Представляет интерес тот факт, что авирулентный штамм *B. pseudomallei* VPA, в геноме которого закрепилась необратимая делеция, вызывает у кроликов антителообразование такого же уровня (по результатам РНГА), что и близкородственный возбудитель III группы патогенности *B. thailandensis* — 1:300–1:400. Как нам кажется, таким образом прослеживается четкая патогенетически значимая связь вирулентных свойств возбудителя мелиоидоза с его иммуногенностью.

Следует отметить, что в низких титрах (1:20–1:40) в отдельных случаях положительные результаты РНГА были продемонстрированы на моделях гипериммунных сывороток против близкородственных возбудителю мелиоидоза

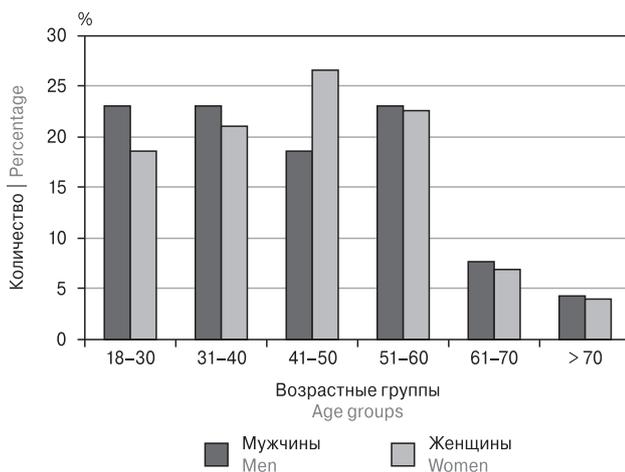


Рисунок 1. Распределение жителей провинции Ха Занг Социалистической Республики Вьетнам, сыворотки которых были изучены в РНГА, по полу и возрасту

Figure 1. IHA-based sex- and age-dependent distribution of residents in the province of Ha Giang of the Socialist Republic of Vietnam

Таблица 3. Результаты РНГА при определении титров мелиоидозных антител в образцах сывороток лиц, проживающих в провинциях Ха Занг, Лангшон, Куангнинь Социалистической Республики Вьетнам

Table 3. IHA results determining titer of serum melioidosis antibodies in persons living in the provinces of Ha Giang, Lang Son, Quang Ninh of the Socialist Republic of Vietnam

Провинция Provinces	Общее число проб Total number of samples	Из них положительные в РНГА в титрах Of these, IHA positive titers							
		1:10		1:20		1:40		1:80	
		n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)
Ха Занг Ha Giang	290	210	72,4 (67–77,2)	27	9,3 (6,5–13,2)	4	1,4 (0,54–3,5)	49	16,9 (13–21,6)
Лангшон Lang Son	195	137	70,3 (63,5–76,2)	15	7,7 (4,7–12,3)	22	11,3 (7,6–16,5)	21	10,8 (7,2–15,9)
Куангнинь Quang Ninh	65	46	70,8 (58,8–80,4)	1	1,5 (0,3–8,2)	8	12,3 (6,4–22,5)	10	15,4 (8,6–26,1)
Всего Total	550	393	71,5 (67,5–75,1)	43	7,8 (5,8–10,4)	34	6,1 (4,5–8,5)	80	14,6 (11,9–17,7)

буркгольдерий *B. ceracia*-комплекса. При этом сыворотки, направленные против патогенных псевдомонад (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. pseudocaligenses*), которые, как известно, также имеют перекрестно реагирующие с возбудителем мелиоидоза антигенные детерминанты, как и сывороточные иммуноглобулины против *F. tularensis* или *Y. pestis*, в реакции с антигенным мелиоидозным диагностикумом в исследуемых разведениях (1:10 и выше) не взаимодействовали, что в целом подтверждает специфические свойства полученного препарата.

В ходе изучения аналитических характеристик эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума чувствительность РНГА при исследовании гипериммунных сывороток лабораторных животных составила 1:320–1:640 и выше (в отдельных случаях до 1:204 800).

В 12 из 15 наблюдений активные центры антител сывороток, которые были получены путем иммунизации лабораторных животных гетерологичными или близкородственными возбудителями, не взаимодействовали с антигенными детерминантами возбудителя мелиоидоза, то есть специфичность диагностикума составила 80%.

Таким образом, РНГА, не требующая применения специализированного оборудования, позволила в эксперименте в течение 2–4 ч получить четкие, специфичные и легко визуализируемые результаты, что явилось весомым основанием для использования РНГА в работе по изучению уровня мелиоидозных антител в сыворотках человека.

С этой целью нами отобраны образцы биопроб жителей как эндемичных (провинции Ха Занг, Лангшон и Куангнинь Социалистической Республики Вьетнам), так и неэндемичной (РФ) местностей.

Контингент лиц, проживающих на территориях провинций Ха Занг, Лангшон и Куангнинь, оказался представлен преимущественно фермерами (49,8%), а также другими категориями

населения (врачи, учителя, рабочие, студенты и др., 51,2%) — 274 и 276 человек соответственно.

Следует отметить, что провинции Ха Занг и Лангшон расположены в северных районах Вьетнама в гористой местности с высоким среднегодовым уровнем осадков и температурой до +22,78°C. Около 90 и 80% населения провинций Ха Занг и Лангшон соответственно составляют сельские жители.

Провинция Куангнинь находится в прибрежной зоне северного Вьетнама примерно в тех же климатических условиях, но является промышленным регионом, связанным, в основном, с до-

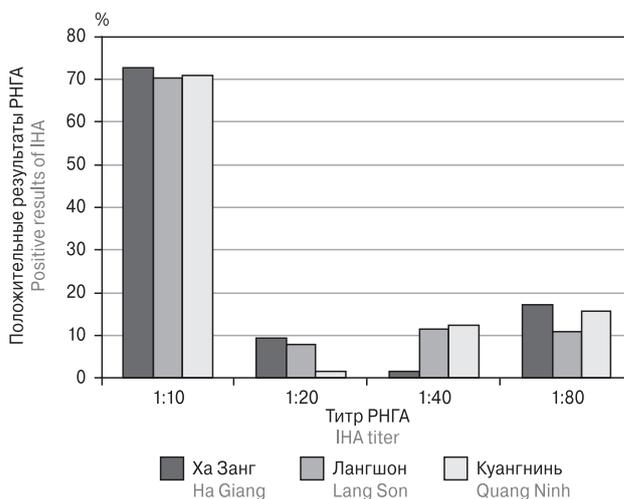


Рисунок 2. Титры РНГА с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом при анализе сывороток клинически здоровых лиц, проживающих на территориях отдельных провинций Социалистической Республики Вьетнам

Figure 2. Serum IHA titers by using Erythrocyte Antigenic Melioidosis Diagnostic Agent in clinically healthy individuals living in the territories of certain provinces of the Socialist Republic of Vietnam

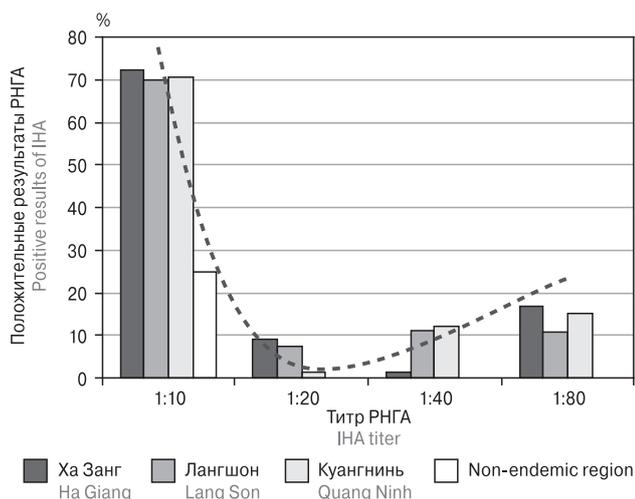


Рисунок 3. Результаты РНГА с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом при изучении специфической активности сывороток лиц, проживающих на территории эндемичного региона Вьетнама и вне его

Figure 3. Serum IHA results by using Erythrocyte Antigenic Melioidosis Diagnostic Agent in individuals living in the territory of the endemic region of Vietnam and outside

бычей каменного угля. Около 50% жителей провинции Куангнинь относят к городскому населению, многие из которых, тем не менее, по роду деятельности имеют близкий контакт с землей.

Такие условия способствуют формированию и поддержанию эндемичного очага мелиоидоза, являющегося источником значительного эпидемиологического риска для проживающих в данном регионе лиц, который, тем не менее, может быть снижен формированием у населения иммунной прослойки (коллективного иммунитета). При этом, согласно литературным данным, вероятной причиной формирования иммунитета у обследуемых лиц, кроме регистрируемого заболевания, может быть циркулирующая штамма возбудителя мелиоидоза со сниженной вирулентностью или контакт с близкородственным видом, что в целом обеспечивает продукцию специфических антител и серопревалентность популяции [9]. Также существует мнение о возможности формирования популяционного иммунитета к *B. pseudomallei* под влиянием авирулентных почвенных штаммов *B. thailandensis*, которые имеют схожую с возбудителем мелиоидоза антигенную структуру и могут, в конечном итоге, приводить к выработке кросс-реактивных антител [8, 19, 20].

И действительно, при исследовании образцов сывороток, полученных от жителей провинций Ха Занг (290), Лангшон (195) и Куангнинь (65), оказалось, что в титре до 1:10 иммуноглобулины более 70% проб вступали в реакцию с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом. По-видимому, эти взаимодействия

обусловлены неспецифическим связыванием разнообразных пулов IgG, присутствующих в сыворотках человека. При этом, начиная с титров от 1:20 и выше, средний уровень положительных результатов РНГА снижался до 7,8% (43), 6,1% (34) и 14,6% (80) соответственно (рис. 3). Среди интактных сывороток положительных результатов РНГА в разведениях от 1:20 и выше не было зарегистрировано ни в одном из наблюдений, что, с нашей точки зрения, является основанием для рекомендации проведения РНГА-исследований, связанных с иммунодиагностикой мелиоидоза, в титрах от 1:20 и выше. Полученные в отдельных случаях результаты титров 1:5–1:10 не могут иметь диагностического значения, так как, несомненно, обусловлены неспецифическими взаимодействиями перекрестно реагирующих сывороточных антител.

По-видимому, нисходящая линия такой условной параболы (рис. 3) отражает, наряду с увеличением титра сывороточных иммуноглобулинов, уменьшение числа неспецифически положительных результатов РНГА, при том что более высокие разведения сывороток, соответствующие восходящей ветви, позволяют выявить в пробах присутствие специфически взаимодействующих с антигенами возбудителя мелиоидоза антител, выработанных иммунными лимфоцитами, возможно вследствие постоянно поддерживаемого контакта макроорганизма с возбудителем или даже перенесенной мелиоидозной инфекции.

Полученные нами данные находят подтверждение в материалах зарубежных авторов. Так, в соответствии с выводами P. Chaichana, присутствие специфических мелиоидозных иммуноглобулинов в сыворотках по результатам РНГА следует регистрировать, начиная с разведения от 1:80 и выше [7].

Cheng называет титры РНГА 1:40–1:80 «низкоположительными» и пограничными, а 1:160 и выше — «высокоположительными», однозначно позволяющими подтвердить диагноз мелиоидоза с помощью некультуральных методов исследования [9].

При изучении некоторых демографических показателей (пол, возраст), выполненном на образцах сывороток, полученных от жителей провинции Ха Занг, показано, что независимо от возраста в титрах от 1:20 оказались серопозитивными 25 из 91 (27,4%) сывороток мужчин и 55 из 199 (27,6%) сывороток женщин, из чего следует, что положительные результаты проб не имеют корреляции ни с полом, ни с возрастом обследуемых [16].

Представленные результаты согласуются с выводами P. Chaichana, которая наиболее важным аспектом серопозитивности популяции считала область проживания людей (село или город) и род их деятельности, но не пол или возраст [7].

Таким образом, на основе выделенных антигенных комплексов *B. pseudomallei* проведено

конструирование эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума, который был подвергнут лиофилизации по многоступенчатой программе [4], позволившей обеспечить в полной мере сохранение его аналитических характеристик как в условиях жаркого тропического климата, так и перепадов давления при авиаперелетах.

С помощью полученного нами эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума в РНГА проведено изучение 550 сывороток крови лиц, проживающих в провинция Ха Занг,

Лангшон и Куангнинь Социалистической Республики Вьетнам, а также 36 интактных сывороток лиц из неэндемичного региона.

По результатам выполненных исследований подтверждено формирование у 30% лиц, проживающих в эндемичной зоне, естественного иммунитета к мелиоидозу в виде присутствия в сыворотках мелиоидозных антител в титрах от 1:20 и выше. При этом не исключено, что титры от 1:80 и выше при иммунодиагностике мелиоидоза могут иметь критическое значение.

Список литературы/References

1. Захарова И.Б., Топорков А.В., Викторов Д.В. Мелиоидоз в аспектах эпидемиологии, клиники и лабораторной диагностики // *Инфекция и иммунитет*. 2021. Т. 11, № 3. С. 409–422. [Zakharova I.B., Toporkov A.V., Viktorov D.V. Melioidosis in aspects of epidemiology, clinic, and laboratory diagnostics. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 409–422. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MIA-1584
2. Калинина О.В., Личная Е.В., Pham T.H.G., Bui T.L.A., Vo V.C., Pham N.Q., Чуланов В.П., Дмитриев А.В. Распространенность парентеральных вирусных гепатитов во Вьетнаме. Под ред. А.Ю. Поповой, А.В. Топоркова. 2019. С. 259–270. [Kalinina O.V., Lichnaia E.V., Pham T.H.G., Bui T.L.A., Vo V.C., Pham N.Q., Chulanov V.P., Dmitriev A.V. Prevalence of parenteral viral hepatitis in Vietnam. Eds.: A.Yu. Popova, A.V. Toporkov. 2019, pp. 259–270. (In Russ.)]
3. Личная Е.В., Фам Т.Ж., Петрова О.А., Чан Т.Н., Нгуен Т.Т., Буй Т.Н., Во В.К., Дмитриев А.В., Калинина О.В. Распространенность гепатита Е среди коренного населения северной провинции Ха Занг, Вьетнам // *Инфекция и иммунитет*. 2021. Т. 11, № 4. С. 692–700. [Lichnaia E.V., Pham T.G., Petrova O.A., Tran T.N., Nguyen T.T., Bui T.N., Vo V.C., Dmitriev A.V., Kalinina O.V. Hepatitis E virus seroprevalence in indigenous residents of the Ha Giang northern province of Vietnam. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 692–700. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-HEV-1764
4. Патент № 2011127595/06 Российская Федерация, МПК F26B 5/06 (2006.01). Способ лиофильной сушки эритроцитарного диагностикума: № 2011127595/06; заявлено 05.07.2011; опубликовано 27.02.2013 / Пушкарь В.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Павлова К.А., Степурина А.М. Федеральное государственное учреждение здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (RU). 9 с. [Patent No. 2011127595/06 Russian Federation, Int. F26B 5/06 (2006.01). Method of lyophilic drying of erythrocyte diagnosticum: No. 2011127595/06; application: 05.07.2011; date of publication 27.02.2013 / Pushkar V.G., Novitskaya I.V., Kulakov M.J., Pavlova K.A., Stepurina A.M. Proprietor: Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie zdravookhraneniya Volgogradskij nauchno-issledovatel'skij protivochumnyj institut Rospotrebnadzora (RU). 9 p.]
5. Патент № 2013135369/15 Российская Федерация, МПК G01N 33/531(2006.01), A61K 39/104 (2006.01). Способ получения антигенного эритроцитарного диагностикума для обнаружения антител к антигенам возбудителей сапа и мелиоидоза: № 2013135369/15; заявлено 2013.07.26; опубликовано 2015.02.10 / Куделина А.М., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Пушкарь В.Г., Илюхин В.И., Будченко А.А., Прохвятилова Е.В., Дубина И.А., Замарин А.Е., Мазурова И.Ю., Куликова А.С., Сенина Т.В. Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU). 9 с. [Patent No. 2013135369/15 Russian Federation, Int. G01N 33/531(2006.01), A61K 39/104 (2006.01). Method for obtaining antigenic erythrocyte diagnosticum for the detection of antibodies to the antigens of the causative agents of glanders and melioidosis: No. 2013135369/15; application: 2013.07.26; date of publication 2015.02.10 / Kudelina A.M., Novitskaya I.V., Kulakov M.Y., Pushkar V.G., Ilyukhin V.I., Budchenko A.A., Prokhvatilova E.V., Dubina I.A., Zamarin A.E., Mazurova I.Yu., Kulikova A.S., Senina T.V. Proprietor: Federal'noe kazennoe uchrezhdenie zdravookhraneniya "Volgogradskij nauchnoissledovatel'skij protivochumnyj institut" Federal'noj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel' i blagopoluchija cheloveka. 9 p.]
6. Brett P.J., Woods D.E. Pathogenesis of and immunity to melioidosis. *Acta Trop.*, 2000, vol. 74, no. 2–3, pp. 201–210. doi: 10.1016/S0001-706X(99)00071-6
7. Chaichana P., Jenjaroen K., Amornchai P., Chumseng S., Langla S., Rongkard P., Sumonwiriya M., Jeeyapant A., Chantratita N., Terarrukkul P., Limmathurotsakul D., Day N.P.J., Wuthiekanun V., Dunachie S.J. Antibodies in melioidosis: the role of the indirect hemagglutination assay in evaluating patients and exposed populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2018, vol. 99, no. 6, pp. 1378–1385. doi: 10.4269/ajtmh.17-0998
8. Charoenwong P., Lumbiganon P., Puapermpoonsiri S., The prevalence of the indirect hemagglutination test for melioidosis in children in an endemic area. *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health*, 1992, vol. 23, no. 4, pp. 698–701.
9. Cheng A.C., O'Brien M., Freeman K., Lum G., Currie B.J. Indirect hemagglutination assay in patients with melioidosis in northern Australia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006, vol. 74, no. 2, pp. 330–334. doi: 10.4269/ajtmh.2006.74.330
10. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, vol. 18, no. 2, pp. 383–416. doi: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005
11. Dong S., Wu L., Long F., Wu Q., Liu X., Pei H., Xu K., Lu Y., Wang Y., Lin Y., Xia Q. The prevalence and distribution of *Burkholderia pseudomallei* in rice paddy within Hainan, China. *Acta Trop.*, 2018, vol. 187, pp. 165–168. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.08.007

12. Inglis T.J.J., Sagripanti J.L. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 11, pp. 6865–6875. doi: 10.1128/AEM.01036-06
13. Manivanh L., Pierret A., Rattanavong S., Kounnavongsa O., Buisson Y., Elliott I., Maeght J.L., Xayyathip K., Silisouk J., Vongsouvath M., Phetsouvanh R., Newton P.N., Lacombe G., Ribolzi O., Rochelle-Newall E., Dance D.A.B. *Burkholderia pseudomallei* in a lowland rice paddy: seasonal changes and influence of soil depth and physico-chemical properties. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-017-02946-z
14. Phuong D.M., Trung T.T., Breitbach K., Tuan N.Q., Nübel U., Flunker G., Khang D.D., Quang N.X., Steinmetz I. Clinical and microbiological features of melioidosis in northern Vietnam. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2008, vol. 102, iss. Supplement_1, pp. S30–S36. doi: 10.1016/S0035-9203(08)70009-9
15. Samy P.R., Stiles B.G., Sethi G., Lim L.H.K. Melioidosis: Clinical impact and public health threat in the tropics. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2017, vol. 11. doi: 10.1371/journal.pntd.0004738
16. So S.Y., Chau P.Y., Aquinas M., Gabriel M., Lam W.K. Melioidosis: a serological survey in a tuberculosis sanatorium in Hong Kong. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1987, vol. 81, no. 6, pp. 1017–1019. doi: 10.1016/0035-9203(87)90384-1
17. Thomas A.D., Forbes-Faulkner J., Parker M. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clay layers at defined depths. *Am. J. Epidemiol.*, 1979, vol. 110, no. 4, pp. 515–521. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112832
18. Wiersinga W.J., Virk H.S., Torres A.G., Currie B.J., Peacock S.J., Dance D., Limmathurotsakul D. Melioidosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2018, vol. 4, no. 1, pp. 1–22. doi: 10.1038/nrdp.2017.107
19. Wuthiekanun V., Chierakul W., Langa S., Chaowagul W., Panpitpat C., Saipan P., Thoujaikong T., Day N.P., Peacock S.J. Development of antibodies to *Burkholderia pseudomallei* during childhood in melioidosis-endemic northeast Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006, vol. 74, no. 6, pp. 1074–1075. doi: 10.4269/ajtmh.2006.74.1074
20. Wuthiekanun V., Langa S., Swaddiwudhipong W., Jedsadapanpong W., Kaengnet Y., Chierakul W., Day N.P., Peacock S.J. Short report: melioidosis in Myanmar: forgotten but not gone? *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006, vol. 75, no. 5, pp. 945–946. doi: 10.4269/ajtmh.2006.75.945

Авторы:

Терешко Д.Л., научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Новицкая И.В., к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник, зав. отделом иммунологии и экспериментального производства МИБП ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Захарова И.Б., к.б.н., доцент, зав. отделом микробиологического мониторинга особо опасных инфекций ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Чиен Д., согендиректор Совместного Российско-Вьетнамского Тропического Научно-исследовательского и технологического центра, г. Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам;

Кузнецов А.Н., д.б.н., согендиректор Совместного Российско-Вьетнамского Тропического Научно-исследовательского и технологического центра, г. Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам;

Кулаков М.Я., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Будченко А.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории протеомного анализа ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Пушкар В.Г., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

Викторов Д.В., д.б.н., доцент, зам. директора ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия.

Топорков А.В., д.м.н., доцент, директор ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия.

Authors:

Tereshko D.L., Researcher, Laboratory of Immunodiagnostic Preparations, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Novitskaya I.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Head of the Department of Immunology and Experimental Production of Medical Immunobiological Preparations, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Zakharova I.B., PhD (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Trien D., Co-director of the Joint Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center, Hanoi, Socialist Republic of Vietnam;

Kuznetsov A.N., PhD, MD (Biology), Co-director of the Joint Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center, Hanoi, Socialist Republic of Vietnam;

Kulakov M.Ya., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Immunodiagnostic Preparations, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Budchenko A.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Proteomic Analysis Laboratory, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Pushkar V.G., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunodiagnostic Preparations, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Viktorov D.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Deputy Director for Science, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;

Toporkov A.V., PhD, MD (Medicine), Director, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation.