

13. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. *Проточная цитометрия в медицине и биологии*. Екатеринбург: РИО УрО РАН; 2013.
16. Тотоян А.А. Роль хемокинов и их рецепторов в иммунорегуляции. *Иммунология*. 2001; (5): 7–15.
21. Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Арсентьев Н.А., Басин В.В., Эсауленко Е.В., Семенов А.В. и др. Анализ популяций Т-хелперных клеток памяти, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6, в периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 160 (8): 204–8.
11. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.* 2007; 27 (3): 469–85.
12. Sallusto F., Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol. Rev.* 2000; 177: 134–40.
13. Zurochka A.V., Khaydukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. *Flow Cytometry in Medicine and Biology. [Protochnaya tsitometriya v meditsine i biologii]*. Ekaterinburg: RIO UrO RAN; 2013. (in Russian)
14. Schaerli P., Willmann K., Lang A.B., Lipp M., Loetscher P., Moser B. CXCR5 chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.* 2000; 192 (11): 1553–62.
15. Morita R., Schmitt N., Bentebibel S.E., Ranganathan R., Bourdery L., Zurawski G. et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011; 34 (1): 108–21.
16. Totolyan A.A. Role of chemokines and their receptors in immunoregulation. *Immunologiya*. 2001; (5): 7–15. (in Russian)
17. Le Coz C., Joublin A., Pasquali J.L., Korganow A.S., Dumortier H., Monneaux F. Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. *PLoS One*. 2013; 8 (9): e75319.
18. Wang Q., Zhai X., Chen X., Lu J., Zhang Y., Huang Q. Dysregulation of circulating CD4+CXCR5+ T cells in type 2 diabetes mellitus. *APMIS*. 2015; 123 (2): 146–51.
19. Espinosa-Ortega F., Gomez-Martin D., Santana-De Anda K., Romo-Tena J., Villasenor-Ovies P., Alcocer-Varela J. Quantitative T cell subsets profile in peripheral blood from patients with idiopathic inflammatory myopathies: tilting the balance towards proinflammatory and pro-apoptotic subsets. *Clin. Exp. Immunol.* 2015; 179 (3): 520–8.
20. Andalib A., Doulabi H., Najafi M., Tazhibi M., Rezaie A. Expression of chemokine receptors on Th1/Th2 CD4+ lymphocytes in patients with multiple sclerosis. *Iran. J. Immunol.* 2011; 8 (1): 1–10.
21. Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Arsent'ev N.A., Basin V.V., Esaulenko E.V., Semenov A.V. et al. The analysis of T helper memory cells populations expressing the chemokine receptors CXCR3 and CCR6 in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis C. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2015; 160 (8): 204–8. (in Russian)
22. Lecureuil C., Combadiere B., Mazoyer E., Bonduelle O., Samri A., Auran B. et al. Trapping and apoptosis of novel subsets of memory T lymphocytes expressing CCR6 in the spleen of HIV-infected patients. *Blood*. 2007; 109 (9): 3649–57.

Поступила 01.10.15

REFERENCES

1. Murphy K.M., Reiner S.L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2 (12): 933–44.
2. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133 (5): 775–87.
3. Geginat J., Paroni M., Maglie S., Alfen J.S., Kastirr I., Gruarin P. et al. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front. Immunol.* 2014; 5: 630.
4. Rivino L., Messi M., Jarrossay D., Lanzavecchia A., Sallusto F., Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J. Exp. Med.* 2004; 200 (6): 725–35.
5. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Ann. Rev. Immunol.* 2011; 29: 621–63.
6. Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V., Maggi L., Liotta F., Mazzinghi B. et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 2007; 204 (8): 1849–61.
7. Kudryavtsev I.V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal*. 2014; 8 (4): 947–64. (in Russian)
8. Sokhnevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Phenotypic characterization and functional features of memory T- and B-cells. *Tsitologiya*. 2015; 57 (5): 311–8. (in Russian)
9. Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. The standardised technique “Study subpopulations of peripheral blood lymphocytes by using flow cytometry”. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal*. 2014; 8 (4): 974–92. (in Russian)
10. Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya*. 2015; 17 (1): 19–26. (in Russian)

Received 01.10.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.981.455-078.33

Еремкин А.В., Елагин Г.Д., Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Богачева Н.В., Кытманов А.А., Куклина Г.В., Тихвинская О.В.

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ И ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 610017, г. Киров, Российская Федерация

Осуществлен подбор моноклональных антител, обладающих иммунохимической активностью к антигенам *Francisella tularensis*, на их основе разработаны иммуноферментная и иммунохроматографическая тест-системы для выявления возбудителя туляремии. Оценка чувствительности и специфичности разработанных тест-систем показала, что образцы обеспечивали выявление штаммов *F. tularensis* в концентрации от $5,0 \cdot 10^5$ м.к.·см⁻³ до $1,0 \cdot 10^6$ м.к.·см⁻³ и не давали ложноположительных результатов при исследовании гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к.·см⁻³.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Francisella tularensis*; моноклональные антитела; иммуноферментный анализ; иммунохроматографический анализ.

Д л я ц и т и р о в а н и я: Еремкина А.В., Елагин Г.Д., Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Богачева Н.В., Кытманов А.А., Куклина Г.В., Тихвинская О.В. Разработка иммуноферментной и иммунохроматографической моноклональных тест-систем для выявления возбудителя туляремии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (3): 184–187. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-3-184-187.

Для корреспонденции: Еремкин Андрей Валентинович, мл. науч. сотр. научно-исследовательского отдела, E-mail: andreieremkin@gmail.com

Eremkin A.V., Elagin G.D., Petchenkin D.V., Fomenkov O.O., Bogatcheva N.V., Kitmanov A.A., Kuklina G.V., Tikhvinskaya O.V.
THE DEVELOPMENT OF IMMUNE ENZYME AND IMMUNE CHROMATOGRAPHIC MONOCLONAL TEST-SYSTEM FOR DETECTING TULAREMIA AGENT

The office of the 48 central research institute of the Minoborona of Russia, 610017 Kirov, Russia

The immune enzyme and immunochromatographic test-systems for detecting tularemia agent were developed on the basis of selected set of monoclonal antibodies having immunochemical activity to antigens Francisella tularensis. The evaluation of sensitivity and specificity of developed test-systems demonstrated that samples provided detection of strains of F.tularensis in concentration from 5.0×10^5 mkxcm-3 to 1.0×10^6 mkxcm-3 and gave no false positive results in analysis of heterologous microorganisms in concentration of 1.0×10^8 mkxcm-3

Key words: *Francisella tularensis; monoclonal antibodies; immune enzyme analysis; immunochromatographic analysis*

For citation: Eremkin A.V., Elagin G.D., Petchenkin D.V., Fomenkov O.O., Bogatcheva N.V., Kitmanov A.A., Kuklina G.V., Tikhvinskaya O.V. The development of immune enzyme and immune chromatographic monoclonal test-system for detecting tularemia agent. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic) 2016; 61 (3): 184-187. (in Russ.) DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-3-184-187.*

For correspondence: Eremkin A.V., research assistant of the scientific research department. e-mail: andreieremkin@gmail.com

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Financing. *The study had no sponsor support.*

Received 20.06.2015
Accepted 15.12.2015

Введение. Туляремия – опасное инфекционное заболевание, протекающее с лихорадкой и характеризующееся развитием гранулем во многих органах [1]. Крупные вспышки и спорадические случаи заболевания периодически регистрируются во многих странах мира, в том числе в Российской Федерации. Особенностью эпидемиологии туляремии является большое разнообразие переносчиков, путей передачи и механизмов заражения.

В настоящее время достигнуты значительные успехи в области лабораторной диагностики туляремии, тем не менее разработка новых диагностических препаратов для детекции *Francisella tularensis*, в том числе на основе иммунологических методов анализа с использованием моноклональных антител (МкАт), не утрачивает актуальности [2].

С развитием гибридной технологии МкАт нашли широкое применение во многих областях биологии. Современным направлением совершенствования иммунодиагностических методов анализа является замена поликлональных антител на моноклональные [3].

Главным преимуществом МкАт является строго определенная специфичность к конкретной антигенной детерминанте – эпитопу. Кроме того, МкАт стандартны по всем биологическим свойствам (авидность, аффинность). Наконец, гибридная технология позволяет наработать МкАт в любое время в практически нелимитированном количестве. Единственным зарегистрированным и разрешенным к применению на территории Российской Федерации средством диагностики возбудителя туляремии, разработанным на основе МкАт, является тест-система ДИАТул-М производства ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, выполненная в формате ДОТ-ИФА [4].

В связи с этим целью настоящей работы стала разработка иммуноферментной и иммунохроматографической моноклональных тест-систем для выявления возбудителя туляремии.

Материал и методы. При разработке тест-систем осуществляли наработку МкАт, продуцируемых культурами гибридных клеточных линий, полученных в филиале ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров).

С этой целью клетки гибридом 31G1F10, 32E5D3, 35B11C8, 36C2F11, 36D5F4 и 31E3B9 в дозе 1–2 млн клеток на животное вводили внутривенно мышам линии BALB/c, предварительно обработанным пристанном, и через

7–10 сут контролировали их приживление. В случае развития у мышей выраженного асцита проводили забор перитонеального экссудата.

Во всех асцитных жидкостях методом иммуноферментного анализа определяли специфическую активность МкАт к антигенам *F. tularensis*, а также определяли класс иммуноглобулинов с использованием иммунохроматографических наборов реагентов IsoQuick Strips and Kits for Mouse Monoclonal Isotyping (Sigma, США).

Асцитные жидкости с титром антител 1:160 000 и более, полученные при культивировании гибридом одного клона, объединяли и использовали для получения специфических иммуноглобулинов. С этой целью их подвергали двукратному последовательному осаждению насыщенным раствором сульфата аммония. Антитела очищали методом ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЕ-сефацелом (Sigma-Aldrich, США). Контроль выхода белка по экстинкции осуществляли посредством проточного ультрафиолетового абсорбциометра и потенциометрического самописца. В полученном растворе МкАт определяли концентрацию белка по методу Лоури [5], а также специфическую активность методом иммуноферментного анализа.

На следующем этапе осуществляли выбор специфических компонентов иммуноферментной тест-системы, обеспечивающих выявление возбудителя туляремии и наиболее высокую чувствительность. Были исследованы различные комбинации полученных специфических туляремийных МкАт при их использовании в сенситине и иммунопероксидазном конъюгате. Синтез конъюгатов МкАт с пероксидазой хрена осуществляли по методике P. Nacane [6]. Рабочее разведение конъюгатов определяли методом «шахматного титрования». В качестве положительного контроля использовали микробную культуру *F. tularensis* штамма 15 НИИЭГ в концентрации $5 \cdot 10^6$ м.к.см⁻³.

Следующим этапом работы стало конструирование экспериментальных образцов иммуноферментной моноклональной тест-системы для выявления возбудителя туляремии. Для этого специфические компоненты тест-системы разводили защитной средой высушивания до концентрации, в 11 раз превышающей рабочее разведение, и подвергали лиофильному высушиванию с предварительной фасовкой в ампулы. Для лиофилизации иммуноферментного конъюгата использовали защитную среду следующего состава: 5 % са-

Таблица 1

Характеристика препаратов туляреминых МкАт

МкАт гибридной клеточной линии	Класс	Объем, мл	Содержание белка, мг·см ⁻³	Специфическая активность, титр	Удельная специфическая активность, ЕА·мг ⁻¹
31G1F10	М	4,2	6,2	1:5 120 000	247 742
32E5D3	М	3,9	6,4	1:2 560 000	120 000
35B11C8	М	4,5	6,3	1:2 560 000	121 904
36C2F11	М	3,9	7,2	1:2 560 000	106 000
36D5F4	М	3,6	12,0	1:5 120 000	128 000
31E3B9	М	4,0	6,1	1:1 280 000	62 950

П р и м е ч а н и е. Удельная специфическая активность – отношение произведения величины, обратной титру антител и соответствующей оптической плотности субстратно-индикаторной смеси, к концентрации белка в данном препарате иммуноглобулинов.

харозы, 10 мг·см⁻³ бычьего сывороточного альбумина в 0,5 М трис-НСl с рН 7,4±0,1; в качестве среды высушивания для иммуноглобулинов применяли 5 % раствор сахарозы в 0,5 М КББ с рН 9,6±0,1.

Сушку проводили в установке для лиофильного высушивания «АЛСУ» (Ижевск, Россия). Ампулы запаивали и помещали на хранение при температуре 4°С. После этапа лиофильного высушивания были отобраны образцы для оценки диагностических возможностей МкАт.

В состав иммуноферментной тест-системы были включены в готовом виде или в виде полуфабрикатов все иммунохимические реагенты, необходимые для постановки твердофазного иммуноферментного анализа в планшетах, за исключением дистиллированной воды. Были изготовлены 3 лабораторно-экспериментальные серии иммуноферментной моноклональной тест-системы для выявления возбудителя туляремии.

Следующим этапом являлась разработка иммунохроматографической моноклональной тест-системы для выявления возбудителя туляремии.

Растворы для получения коллоидного золота и его конъюгатов с антителами готовили на деионизированной воде, полученной при использовании установки Milli-Q (Millipore, США).

В качестве специфических компонентов иммунохроматографической тест-системы были использованы: МкАт гибридных клеточных линий 31E3B9 и 35B11C8, кроличьи антивидовые антитела к иммуноглобулинам мыши. Все специфические компоненты получены специалистами филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров).

Для изготовления иммунохроматографической тест-системы применяли комплект мембран фирмы MDI Easurack (Advanced Microdevice, Индия): нитроцеллюлозную мембрану – CNPF-SN12-L2-P25 со скоростью ламинарного потока 4 см за 125 с для нанесения тестовой и контрольной зон; подложку для конъюгата – PT-R5; подложку для образца – GFB-R7L (0,6); подложку для адсорбента – APO45.

Коллоидное золото (КЗ) получали с использованием золотохлористоводородной кислоты (Sigma, США), по методу Френса [7]. Результат электронной микроскопии показал высокую степень однородности частиц по размерным характеристикам. Для получения конъюгата коллоидного золота с антителами (КЗ-АТ) были использованы частицы диаметром 30±2 нм.

Определение связывания антител с КЗ проводили по рекомендациям [8]. Оптимальную концентрацию МкАт для получения конъюгата КЗ-АТ определяли на основании полученных фотометрических данных. Для конъюгирования в соответствии с рекомендациями выбрали концентрацию антител, на 10–15% превышающую точку выхода на плато.

При приготовлении конъюгата КЗ-АТ в коллоидное золото с рН 9,0 вносили раствор иммуноглобулинов с выбранной концентрацией. Смесь КЗ-АТ перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. По окончании времени инкубации в смесь добавляли 4% ПЭГ-40 000 (Sigma, США) в объеме, необходимом для получения конечной концентрации 0,25%, и вновь перемешивали содержимое на вортексе. Смесь инкубировали в течение 15 мин. Удаление несвязавшихся антител от частиц КЗ проводили центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин. По окончании центрифугирования супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 0,025 М трис-буфере с рН 8,0, содержащем 0,25% БСА и 10% сахарозу.

Конъюгат наносили на мембрану методом пропитывания с плотностью распределения реагента на подложке 30 мкл на 1 см².

Для формирования аналитической и контрольной зон иммуноглобулины в выбранной концентрации наносили при помощи диспенсера с плотностью нанесения 0,1 мкл·мм⁻¹.

Подложки с нанесенным конъюгатом и готовые рабочие мембраны сушили в вакууме при температуре 40°С в течение 2 ч.

Собранные и нарезанные по 4,5 мм иммунохроматографические тест-системы помещали в пластиковые контейнеры (стрипы), которые запаивали в фольгированные пакеты с силикагелевым осушителем. Было изготовлено 3 лабораторные серии иммунохроматографической моноклональной тест-системы для выявления возбудителя туляремии.

На заключительном этапе проводили лабораторно-

Таблица 2

Чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении *F. tularensis* штамма 15 НИИЭГ в условиях постановки реакций с использованием разных комбинаций туляреминых МкАт

МкАт гибридной клеточной линии, используемые в качестве сенситива	Чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении <i>F. tularensis</i> штамма 15 НИИЭГ с использованием иммунопероксидазного конъюгата, приготовленного на основе препарата, ·10 ⁶ м.к.·см ³					
	МкАт гибридной клеточной линии					
	31G1F10	32E5D3	35B11C8	36C2F11	36D5F4	31E3B9
31G1F10	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
32E5D3	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0
35B11C8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
36C2F11	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
36D5F4	0,5	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0
31E3B9	1,0	4,0	0,25	2,0	4,0	2,0

Чувствительность и специфичность иммуноферментной и иммунохроматографической моноклональных тест-систем для обнаружения и идентификации возбудителя туляремии

Вид микроорганизма	Количество исследованных штаммов	Количество выявляемых штаммов с помощью иммуноферментной тест-системы	Количество выявляемых штаммов с помощью иммунохроматографической тест-системы	Определяемая концентрация, м.к. · см ⁻³ (n = 3)
<i>F. tularensis</i>	7	7	7	0,5·10 ⁶ –1,0·10 ⁶
<i>Y. pestis</i>	3	0	0	1,0·10 ⁸
<i>Y. enterocolitica</i>	3	0	0	1,0·10 ⁸
<i>E. coli</i>	1	0	0	1,0·10 ⁸
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (I)	3	0	0	1,0·10 ⁸
<i>B. mallei</i>	3	0	0	1,0·10 ⁸
<i>B. pseudomallei</i>	3	0	0	1,0·10 ⁸
<i>B. abortus</i>	6	0	0	1,0·10 ⁸
<i>B. melitensis</i>	6	0	0	1,0·10 ⁸
<i>B. suis</i>	4	0	0	1,0·10 ⁸
<i>L. pneumophila</i> (1)	3	0	0	1,0·10 ⁸
<i>B. anthracis</i>	3	0	0	1,0·10 ⁸
<i>V. cholerae</i>	1	0	0	1,0·10 ⁸

Пр и м е ч а н и е. n – количество определений.

экспериментальное изучение разработанных тест-систем. Чувствительность тест-системы оценивали при исследовании семи штаммов *F. tularensis*. Оценку специфичности проводили с рядом гетерологичных микроорганизмов: *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *L. pneumophila*, *B. anthracis*, *V. cholerae*, взятых в концентрации 1,0·10⁸ м.к. · см⁻³.

Результаты и обсуждение. На первом этапе разработки иммуноферментной и иммунохроматографической моноклональных тест-системы провели наработку и определили иммунохимическую активность МкАт методом ИФА к *F. tularensis* (табл. 1).

Как следует из анализа данных, представленных в табл. 1, все приготовленные препараты туляреминых МкАт относятся к классу М, характеризовались содержанием белка 6,1 мг · см⁻³ и более, специфической активностью в титре антител 1:128 000 и выше, а также имели высокий уровень удельной специфической активности и как следствие этого оказались перспективными в плане создания на их основе иммуноферментной и иммунохроматографической тест-систем, предназначенных для выявления *F. tularensis*.

В ходе отбора пары МкАт для использования в качестве сенситина и иммунопероксидазного конъюгата, обладающей наибольшей чувствительностью при выявлении *F. tularensis* штамма 15 НИИЭГ, максимальную чувствительность 0,25·10⁶ м.к. · см⁻³ обеспечивали антитела гибридных клеточных линий 31ЕЗВ9 и 35В11С8 (табл. 2).

Показатель чувствительности снижался в 2 раза после этапа лиофильного высушивания специфических компонентов иммуноферментной тест-системы и составил 0,5·10⁶ м.к. · см⁻³.

В дальнейшем МкАт гибридных клеточных линий 31ЕЗВ9 и 35В11С8 использовали при разработке иммунохроматографической тест-системы.

На этапе лабораторно-экспериментального изучения разработанных тест-систем провели оценку их чувствительности и специфичности (табл. 3).

Образцы иммуноферментной тест-системы обеспечивали выявление штаммов *F. tularensis* в концентрации

Т а б л и ц а 3

5,0·10⁵ м.к. · см⁻³, иммунохроматографической тест-системы – в концентрации 1,0·10⁶ м.к. · см⁻³ и не давали ложноположительных результатов при исследовании гетерологичных микроорганизмов в концентрации 1,0·10⁸ м.к. · см⁻³.

Выводы. 1. В результате проведенных исследований разработаны высокочувствительные и специфичные моноклональные тест-системы для выявления возбудителя туляремии: иммуноферментная тест-система обеспечивает выявление штаммов *F. tularensis* в концентрации 5,0·10⁵ м.к. · см⁻³, иммунохроматографическая – в концентрации 1,0·10⁶ м.к. · см⁻³, тест-системы не дают ложноположительных результатов при исследовании гетерологичных микроорганизмов в концентрации 1,0·10⁸ м.к. · см⁻³.

2. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения разработанных тест-систем для выявления возбудителя туляремии в условиях стационарных лабораторий, а также в полевых условиях мобильными диагностическими группами.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 5–8 см. REFERENCES)

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство*. М.: ЗАО «Шико»; 2013.
2. Сырова Н.А., Терешкина Н.Е., Девдариани З.Л. Современное состояние иммунодиагностики туляремии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008; 3 (97): 12–5.
4. Терешкина Н.Е., Терехова И.В., Сырова Н.А., Девдариани З.Л., Ляшова О.Ю., Григорьева Г.В. и др. Конструирование и медицинские испытания моноклональной дот-иммуноферментной тест-системы для детекции туляреминого микроба «ДИАТул-М». *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; (2): 42–5.

Поступила 20.06.15

REFERENCES

1. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., eds. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: A Practical Guide. [Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney: Prakticheskoe rukovodstvo]*. Moscow: ZAO "Shiko"; 2013. (in Russian)
2. Syrova N.A., Tereshkina N.E., Devdariani Z.L. The current state of immunodiagnosics tularemia. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2008; (3 (97)): 12–5. (in Russian)
3. Peruski A.H., Peruski L.F.Jr. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10 (4): 506–13.
4. Tereshkina N.E., Terekhova I.V., Syrova N.A., Devdariani Z.L., Lyashova O.Yu., Grigor'eva G.V. et al. Construction and medical tests monoclonal dot-ELISA test kits for the detection of tularemia microbe "DIATul-M. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2013; (2): 42–5. (in Russian)
5. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193 (1): 265–75.
6. Nakane P., Lavoai A. Peroxidase-labeled antibody – new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22 (12): 1084–91.
7. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.* 1973; 241: 20–2.
8. Hermanson G.T. *Bioconjugat Technique*. 2nd Ed. Amsterdam: Academic Press; 2008.

Received 20.06.15