

З.Л.Девдариани, Н.А.Сырова, Е.А.Михеева, И.В.Терехова, Н.М.Ермаков, Г.В.Григорьева,
О.А.Лобовикова, И.В.Шульгина

КОНСТРУИРОВАНИЕ И МЕДИЦИНСКИЕ ИСПЫТАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНОЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КАПСУЛОСОДЕРЖАЩИХ ШТАММОВ ЧУМНОГО МИКРОБА «ИФАПЕСТФ1-М»

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель исследований. Разработка и медицинские испытания «Тест-системы иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной (ИФАПестФ1-М)». **Материалы и методы.** В работе использованы материалы для постановки сэндвич-варианта ИФА. В качестве диагностического иммунореагента применяли МКА 1В3 к F1 *Y. pestis*. Для определения чувствительности и специфичности сконструированной иммуноферментной тест-системы исследованы образцы 24 природных и генетически модифицированных pFra⁺ и pFra⁻ штаммов *Y. pestis* и 56 штаммов гетерологичных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. **Результаты и выводы.** На основе моноклональных антител к капсульному антигену *Yersinia pestis* разработана «Тест-система иммуноферментная для детекции чумного микроба моноклональная (ИФАПестФ1-М)», которая характеризуется высокой специфичностью и позволяет выявлять капсулосодержащие штаммы возбудителя чумы в образцах биологического материала и проводить идентификацию чистых культур с чувствительностью $5 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ м.к./мл. Она не уступает по основным параметрам препарату сравнения «Иммуноглобулином диагностическим чумным флуоресцирующим адсорбированным лошадиным», лиофилизату для диагностических целей, производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», обладая при этом такими преимуществами, как объективный учет результатов анализа и возможность их документирования. Диагностическая моноклональная тест-система (ИФАПестФ1-М) зарегистрирована в Росздравнадзоре № РЗН 2013/711 от 31.05.2013 г. в соответствии с приказом № 2161-Пр. 113 от 31.05.2013 г. и допущена к обращению на территории Российской Федерации.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, капсульный антиген Ф1, моноклональные антитела, диагностическая тест-система, иммуноферментный анализ, иммунодиагностика.

Корреспондирующий автор: Девдариани Зураб Леванович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Z.L.Devdariani, N.A.Syrova, E.A.Mikheeva, I.V.Terekhova, N.M.Ermakov, G.V.Grigor'eva,
O.A.Lobovikova, I.V.Shul'gina

Construction and Medical Trials of Monoclonal Immuno-Enzyme Test-System for the Detection of Encapsulated Plague Agent Strains, "EIAPESTF1-M"

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Objective of the study was to develop and then conduct medical trials of the "Monoclonal immune-enzyme test-system for the detection of plague agent ("EIAPESTF1-M"). **Materials and methods.** Utilized were materials for carrying out sandwich EIA. MCA 1B3 to *Y. pestis* F1 served as diagnostic immune-reagent. To determine sensitivity and specificity of the designed immune-enzyme test-system, investigated were samples of 24 natural and genetically modified pFra⁺ and pFra⁻ *Y. pestis* strains and 56 strains of heterologous bacteria *Enterobacteriaceae* family. **Results and conclusions.** Based on monoclonal antibodies to *Yersinia pestis* capsular antigen, constructed was "Monoclonal immune-enzyme test-system for the detection of plague agent ("EIAPESTF1-M"), which is characterized by high specificity and allows for the detection of encapsulated plague agent strains in biological samples and for identification of pure cultures with sensitivity of $5 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ mc/ml. It is highly competitive with comparator drug – "Diagnostic fluorescent absorbed equine plague immunoglobulins", lyophilizate for diagnostic purposes, by RusRAPI "Microbe". It possesses such advantages as objective result recording and capability of result documentation. "EIAPESTF1-M" is registered in the RF Federal Service for Surveillance in the Sphere of Healthcare and Social Development, reference No 2013/711, dated 31.05.2013 and approved for use in the territory of the Russian Federation.

Key words: *Yersinia pestis*, capsular antigen F1, monoclonal antibodies, diagnostic test-system, enzyme immune-assay, immunodiagnostics.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Zurab L. Devdariani, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Devdariani Z.L., Syrova N.A., Mikheeva E.A., Terekhova I.V., Ermakov N.M., Grigor'eva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V. Construction and Medical Trials of Monoclonal Immuno-Enzyme Test-System for the Detection of Encapsulated Plague Agent Strains, "EIAPESTF1-M". *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:85–89. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-85-89

На территории стран Содружества Независимых Государств действует 42 природных очага чумы, расположенных в равнинных и горных ландшафтах

Кавказа и Закавказья, Северо-Западного и Северного Прикаспия, Средней Азии, Сибири и характеризующихся различной биоценотической, эпизоотической

и эпидемической активностью [2, 4]. В настоящее время сохраняется напряженная эпидемиологическая обстановка и неблагоприятный прогноз эпизоотической ситуации в очагах Северо-Западного Прикаспия и Сибири [6]. Чума в природных очагах регистрируется в виде спорадических случаев или разлитых эпизоотий в популяциях диких грызунов, как правило, основных носителей. В эпизоотический процесс могут вовлекаться также второстепенные и случайные носители из числа диких животных и синантропных грызунов [5], при этом возможно заражение чумой человека [3].

В связи с вышеизложенным по-прежнему актуальной остается разработка новых препаратов для детекции *Yersinia pestis*. Особый интерес представляет конструирование иммуноферментных тест-систем на основе моноклональных антител (МКА), которые, благодаря своей способности к взаимодействию с уникальным диагностически значимым эпитопом поверхностно расположенного бактериального антигена, обеспечивают строгую специфичность моноклональных диагностикумов [7, 8].

Отсутствие в Российской Федерации современных эффективных иммунодиагностических препаратов для обнаружения возбудителя чумы при проведении эпизоотологического обследования природных очагов этой инфекции предопределило цель данного исследования по разработке и внедрению в практику здравоохранения диагностической иммуноферментной тест-системы, основу которой составили моноклональные антитела к капсульному антигену (Ф1) *Y. pestis*.

Материалы и методы

В сконструированной тест-системе реализован сэндвич-вариант ИФА. Для сенсibilизации полистироловых планшетов отечественного производства (Медполимер, Россия), использованных в качестве твердой фазы, применяли МКА 1В₃ к Ф1 *Y. pestis*, выделенные методом высаливания [8] из асцитических жидкостей зараженных гибридомой *Y. pestis* 1В₃ мышей инбредной линии BALB/c в концентрации 10 мкг/мл. Свободные сайты на пластике блокировали 0,5 % раствором молока обезжиренного сухого (ГОСТ 10970–87). Капсульный антиген чумного микроба, содержащийся в исследуемом материале, после связывания с моноклональными иммуноглобулинами проявляли при помощи МКА 1В₃, конъюгированных с пероксидазой хрена перйодатным методом [8], в рабочем разведении. Положительным контрольным образцом (ПКО-ЧМ) служила инактивированная сухая взвесь *Y. pestis* EV в концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./мл.

В отрицательный контроль вносили фосфатно-солевой буферный раствор.

Высушивание пероксидазного конъюгата и ПКО-ЧМ осуществляли с использованием центрифуги-концентратора CentriVar 7310030 (Labconco, США)

при температуре 4 °С, скорости вращения ротора 1425 об/мин и давлении $1 \cdot 10^{-4}$ торр. В качестве стабилизатора к препаратам добавляли 3 % сахарозы. После высушивания активность препаратов определяли в непрямом ИФА.

Хромогенным субстратом в ИФА служил 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), diammonium salt (ABTS) (Sigma, США).

На этапах разработки тест-системы ИФАПестФ1-М исследовали образцы инактивированных микробных взвесей 24 природных и генетически модифицированных pFra⁺ и pFra⁻ штаммов *Y. pestis*, а также 56 штаммов гетерологичных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в различных концентрациях, смешанные культуры бактерий, а также искусственно контаминированный указанными микроорганизмами биологический материал (сыворотки крови человека, суспензии внутренних органов лабораторных аутбредных мышей). Работу с патогенными бактериями и обеззараживание биологического материала проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» [1].

При проведении медицинских испытаний тест-системы использовали инактивированные чистые культуры 24 штаммов *Y. pestis* в концентрации $1 \cdot 10^7$, $1 \cdot 10^6$ и $1 \cdot 10^5$ м.к./мл (всего 72 образца), чистые культуры гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./мл, включая *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. typhi*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei* (20 образцов), пробы сыворотки крови человека, контаминированной *Y. pestis* (21 образец), пробы сыворотки крови человека, контаминированной гетерологичными микроорганизмами (10 образцов), суспензии внутренних органов мышей, контаминированные *Y. pestis* (21 образец), суспензии внутренних органов мышей, контаминированные гетерологичными бактериями (9 образцов).

Все виды материала тестировали с применением экспериментальных серий тест-системы, приготовленных *ex tempore*, а также хранившихся в течение шести месяцев.

Учет результатов анализа осуществляли визуально и спектрофотометрически с использованием мультисканального фотометра «Multiskan EX» (Китай) при длине волны 405 нм. Результат анализа считали положительным, если показатель оптической плотности опытного образца (ОП)обр в 2 или более раз превышал показатель оптической плотности контрольного образца (К)обр.

В качестве препарата сравнения при проведении медицинских испытаний использовали «Иммуноглобулины диагностические чумные флуоресцирующие адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей, производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (серия 110). Подготовку и исследование материала про-

водили в соответствии с инструкцией по применению иммуноглобулинов. Окрашенные мазки просматривали под люминесцентным микроскопом Primo Star iLED (Carl Zeiss, Германия) с использованием иммерсионного масла. Учет результатов осуществляли визуально по четырехкрестовой системе.

Результаты и обсуждение

Иммунореагентную основу тест-системы «ИФАПестФ1-М» составили МКА к диагностически значимому антигену *Y. pestis* – Ф1 [5, 10], что обеспечило специфичность и стандартность разработанно-

Таблица 1

Результаты исследования проб биологического материала, контаминированного различными штаммами *Y. pestis*, с использованием тест-системы иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной (ИФАПестФ1-М)

Вид биологического материала	Штамм, использованный для контаминации	Концентрация микроорганизмов в образце (м.к./мл)	Серия 02			Серия 03		
			ОПср (К-)×2 / ОП (К+)	ОП образцов	Оценка результата	ОПср (К-)×2 / ОП (К+)	ОП образцов	Оценка результата
				ОП1/ОП2/ОПобр			ОП1/ОП2/ОПобр	
Сыворотка крови человека	<i>Y. pestis</i> A-1108 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	0,081 /1,503	0,675/0,669/ 0,672	Полож.	0,081 /1,448	0,661/0,662/ 0,662	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,535/0,526/ 0,531	Полож.	«	0,541/0,537/ 0,539	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,042/0,039/ 0,041	Отр.	«	0,042/0,039/ 0,041	Отр.
	<i>Y. pestis</i> 231 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,655/0,721/ 0,688	Полож.	«	0,652/0,730/ 0,691	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,502/0,592/ 0,547	Полож.	«	0,504/0,587/ 0,546	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,053/0,041/ 0,047	Отр.	«	0,053/0,042/ 0,048	Отр.
	<i>Y. pestis</i> 2377 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,709/0,606/ 0,658	Полож.	«	0,708/0,586/ 0,647	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,614/0,483/ 0,549	Полож.	«	0,619/0,487/ 0,553	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,042/0,039/ 0,041	Отр.	«	0,043/0,039/ 0,041	Отр.
	<i>Y. pestis</i> KM-225 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,822/0,733/ 0,778	Полож.	«	0,817/0,737/ 0,777	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,595/0,537/ 0,566	Полож.	«	0,586/0,543/ 0,565	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,039/0,044/ 0,042	Отр.	«	0,039/0,044/ 0,042	Отр.
	<i>Y. pestis</i> И-3131 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,673/0,649/ 0,661	Полож.	«	0,673/0,651/ 0,662	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,463/0,585/ 0,524	Полож.	«	0,463/0,546/ 0,505	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,041/0,050/ 0,046	Отр.	«	0,042/0,050/ 0,046	Отр.
	<i>Y. pestis</i> И-3358 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	0,074 /1,952	0,556/0,522/ 0,539	Полож.	0,075 /1,991	0,582/0,550/ 0,566	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,398/0,522/ 0,460	Полож.	«	0,407/0,557/ 0,482	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,042/0,038/ 0,040	Отр.	«	0,042/0,038/ 0,040	Отр.
Суспензия внутренних органов мышей	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,808/0,869/ 0,839	Полож.	«	0,840/0,900/ 0,870	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,362/0,407/ 0,386	Полож.	«	0,378/0,422/ 0,400	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,081/0,094/ 0,088	Полож.	«	0,085/0,103/ 0,094	Полож.
	<i>Y. pestis</i> M-1814 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,867/0,824/ 0,846	Полож.	«	0,903/0,861/ 0,882	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,371/0,393/ 0,382	Полож.	«	0,392/0,405/ 0,399	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,080/0,074/ 0,077	Полож.	«	0,082/0,077/ 0,080	Полож.
	<i>Y. pestis</i> A-1122 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,784/0,961/ 0,873	Полож.	«	0,810/1,002/ 0,906	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,359/0,456/ 0,408	Полож.	«	0,373/0,473/ 0,423	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,075/0,087/ 0,081	Полож.	«	0,077/0,089/ 0,083	Полож.
	<i>Y. pestis</i> И-3131 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,907/0,859/ 0,883	Полож.	«	0,943/0,894/ 0,919	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,428/0,384/ 0,406	Полож.	«	0,444/0,396/ 0,420	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,075/0,072/ 0,074	Отр.	«	0,078/0,076/ 0,077	Полож.
	<i>Y. pestis</i> И-3358 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,828/0,827/ 0,828	Полож.	«	0,859/0,874/ 0,867	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,391/0,370/ 0,381	Полож.	«	0,405/0,395/ 0,400	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,074/0,069/ 0,072	Отр.	«	0,077/0,074/ 0,076	Полож.
	<i>Y. pestis</i> M-570 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,675/0,789/ 0,732	Полож.	«	0,690/0,816/ 0,753	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,382/0,398/ 0,390	Полож.	«	0,402/0,417/ 0,410	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,075/0,079/ 0,077	Полож.	«	0,078/0,081/ 0,080	Полож.
	<i>Y. pestis</i> C-358 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,820/0,811/ 0,816	Полож.	«	0,855/0,834/ 0,845	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,344/0,358/ 0,351	Полож.	«	0,361/0,375/ 0,368	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,073/0,073/ 0,073	Отр.	«	0,076/0,076/ 0,076	Полож.

Примечания: ОП1 – оптическая плотность в 1-й лунке; ОП2 – оптическая плотность во 2-й лунке; ОПобр – среднее арифметическое значение двух лунок с одинаковым образцом.; ОПср(К-) – среднее арифметическое значение в лунках с отрицательным контрольным образцом; ОП (К+) – значение оптической плотности в лунках с положительным контролем.

го препарата.

На первом этапе исследований тест-систему «ИФАПестФ1-М» применяли для тестирования чистых культур микроорганизмов. Из 24 штаммов *Y. pestis* 23 культуры (95,8 %) выявлены в минимальной концентрации $1 \cdot 10^6$ м.к./мл; лишь 1 штамм (*Y. pestis* 2377 (pFra⁺) (4,2 %) обнаружен в более низкой концентрации – $1 \cdot 10^5$ м.к./мл. В связи с этим в последующих экспериментах *Y. pestis* использовали в трех концентрациях – $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$ и $1 \cdot 10^7$ м.к./мл. Ни с одним из тестируемых штаммов гетерологичных бактерий взаимодействия не зарегистрировано, что подтверждает высокую специфичность МКА 1В₃, полученных к капсульному антигену чумного микроба.

При исследовании смешанных культур и искусственно контаминированного биологического материала с помощью тест-системы «ИФАПестФ1-М» показатель чувствительности совпадал с таковым при тестировании чистых культур. Положительная реакция отмечалась только с пробами, содержащими pFra⁺ штаммы *Y. pestis*.

С целью увеличения стабильности и срока хранения моноклонального чумного конъюгата и ПКО-ЧМ после проведения предварительных исследований с жидкими формами названных реагентов осуществляли их высушивание под вакуумом, используя методику, предложенную нами ранее [7]. Оказалось, что реакционная способность ПКО-ЧМ после высушивания сохранялась. В то же время активность конъюгата снижалась в среднем на 20 %, что нередко отмечается при высушивании белковых препаратов [9]. Изменения активности высушенных форм реагентов в течение срока наблюдения (6 месяцев) не происходило, что позволило сделать вывод о приемлемости включения их в состав тест-системы «ИФАПестФ1-М».

Следующим этапом стало изучение стабильности скомпонованной тест-системы при хранении. Результаты тестирования образцов, аналогичных вышеописанным, с использованием экспериментальных серий тест-систем, хранившихся в течение 3 и 6 месяцев, полностью коррелировали с таковыми, полученными при применении реагентов, приготовленных непосредственно перед постановкой ИФА. Это свидетельствовало о стабильности разработанного диагностикума в течение срока наблюдения.

При проведении медицинских испытаний использовали 2 серии (02 и 03) набора реагентов «Тест-система иммуноферментная для детекции чумного микроба моноклональная (ИФАПестФ1-М)». Всего исследовано 153 образца чистых культур микроорганизмов и контаминированного биоматериала.

Установлено, что тест-система «ИФАПестФ1-М» позволяет выявлять капсулосодержащие штаммы чумного микроба в чистых культурах и биологическом материале от людей и животных в минимальной концентрации $5 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ м.к./мл при отрицательной реакции с гетерологичными бактериями. Чумной ми-

кроб выявлен в концентрации $1 \cdot 10^6$ м.к./мл в 100 % случаев, а в концентрации $1 \cdot 10^5$ м.к./мл – в 8,3.

При испытании тест-системы «ИФАПестФ1-М» серий 02 и 03 отмечалось допустимое расхождение среди положительных результатов в 2,0 % случаев, преимущественно при исследовании биологического материала (таблица). Расхождения по отрицательным результатам не было. Тест-система «ИФАПестФ1-М», не уступая по основным параметрам препарату сравнения, обладала такими несомненными преимуществами как отсутствие субъективности учета реакции и возможность документирования результатов анализа.

Разработанный набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для детекции чумного микроба моноклональная (ИФАПестФ1-М)» зарегистрирован в Росздравнадзоре № РЗН 2013/711 от 31.05.2013 и допущен к обращению на территории Российской Федерации.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). СП 1.3.3118–13. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2014. 195 с.
2. Бурделов Л.А., редактор. Атлас распространения особо опасных инфекций в Республике Казахстан. Алматы; 2012. 232 с.
3. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Шарова И.Н., Попов Н.В., Кузнецов А.А. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:9–16.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2004. 192 с.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
6. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Матросов А.Н., Князева Т.В., Кузнецов А.А., Федоров Ю.М., Попов В.П., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М., Чипанин Е.В., Дубянский В.М., Малецкая О.В., Григорьев М.П., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпизоотическая активность природных очагов чумы РФ в 2014 г. и прогноз на 2015 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 1:10–7.
7. Терешкина Н.Е., Терехова И.В., Сырова Н.А., Девдариани З.Л., Ляшова О.Ю., Григорьева Г.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Иваненко И.Л., Захарова Н.Б., Безрукова Г.А., Спирин В.Ф. Конструирование и медицинские испытания моноклональной dot-иммуноферментной тест-системы для детекции туляремийного микроба «ДИАТул-М». *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:42–5.
8. Фримель Г., редактор. Иммунологические методы. М.: Медицина; 1987. 472 с.
9. Abdou-Fattah A.M., Kalonia D.S., Pikal M.J. The Challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: product quality implication. *J. Pharm. Sci.* 2007; 96(8):1886–916. DOI: 10.1002/jps.20842.
10. Butler T. Plague into the 21st century. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49(5):736–42. DOI: 10.1086/604718.

References

1. [Safety of work with microorganisms of the I–II groups of pathogenicity (hazard)]. SR 1.3.3118–13. M.: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of the Rosпотребнадзор; 2014. 195 p.
2. Burdelov L.A., editor. [Atlas of Dissemination of Particularly Dangerous Infections in the Republic of Kazakhstan]. Amaty; 2012. 232 p.
3. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Shchuchinov L.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Rozhdvestvensky

E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sharova I.N., Popov N.V., Kuznetsov A.A. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 1. Epidemiological and epizootological peculiarities of plague manifestations in the Gorno-Altai high-mountain (Sailyugemsky) natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:9–16.

4. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the territory of the Caucasus, Caspian-Sea Region, Central Asia and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.

5. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. M.: "Shiko"; 2013. 560 p.

6. Popov N.V., Bezsmertny V.E., Matrosov A.N., Knyazeva T.V., Kuznetsov A.A., Fedorov Yu.M., Popov V.P., Verzhutsky D.B., Korzun V.M., Chipanin E.V., Dubyansky V.M., Maletskaya O.V., Grigor'ev M.P., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kuttyrev V.V. [Epizootic activity of natural plague foci in the territory of the Russian Federation in 2014 and prognosis for 2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 1:10–7.

7. Tereshkina N.E., Terekhova I.V., Syrova N.A., Devdariani Z.L., Lyashova O.Yu., Grigor'eva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V., Ivanenko I.L., Zakharova N.B., Bezrukova G.A., Spirin V.F. [Constructing and medical trials of a monoclonal dot-immuno-enzyme test-system "DIATul-M" for tularemia microbe detection]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:42–5.

8. Frimel G., editor. [Immunological Methods]. M.: Meditsina; 1987. 472 p.

9. Abdul-Fattah A.M., Kalonia D.S., Pikal M.J. The Challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: product quality implication. *J. Pharm. Sci.* 2007; 96(8):1886–916. DOI: 10.1002/jps.20842.

10. Butler T. Plague into the 21st century. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49(5):736–42. DOI: 10.1086/604718.

Authors:

Devdariani Z.L., Syrova N.A., Mikheeva E.A., Terekhova I.V., Ermakov N.M., Grigor'eva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Девдариани З.Л., Сырова Н.А., Михеева Е.А., Терехова И.В., Ермаков Н.М., Григорьева Г.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 13.01.16.