

DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-60-65

УДК 616.98:579.841.11

А.А. Кытманов, Г.Д. Елагин, Г.В. Куклина, Д.В. Печенкин, О.О. Фоменков, А.В. Еремкин,
С.С. Ипатов, Э.Р. ЗиганшинРАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны, Киров, Российская Федерация

Цель. Создание лабораторных образцов иммуноферментных моноклональных тест-систем для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза. **Материалы и методы.** В работе использованы микробные культуры и гибридные клеточные линии, полученные из Государственной коллекции микроорганизмов филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров). Клетки гибридом культивировали в перитонеальной полости мышей линии BALB/c. Препараты сапных и мелиоидозных моноклональных антител выделяли из асцитных жидкостей осаждением сульфатом аммония и очисткой ионообменной хроматографией. Специфические компоненты создаваемых тест-систем подвергали сублимационному высушиванию в соответствующих защитных средах. Исследование диагностических свойств разработанных тест-систем проводили методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа. **Результаты и обсуждение.** В результате работы получены препараты моноклональных антител *in vivo*, а также выделены и очищены иммуноглобулины из асцитных жидкостей. Подобраны пары моноклональных антител для изготовления специфических компонентов. Изготовлены лабораторно-экспериментальные серии иммуноферментных моноклональных тест-систем, позволяющие специфически выявлять возбудителей сапа и мелиоидоза в концентрации $0,5 \cdot 10^6$ м.к./мл и более. Показано отсутствие перекрестных реакций с близкородственными сапрофитами и гетерологичными микроорганизмами в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к./мл. Показана принципиальная возможность проведения дифференциации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* методом иммуноферментного анализа. Тест-системы перспективны для последующей регистрации в качестве медицинских изделий для диагностики *in vitro*.

Ключевые слова: сап, мелиоидоз, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ.

Корреспондирующий автор: Кытманов Алексей Александрович, e-mail: 23527@mil.ru.

Для цитирования: Кытманов А.А., Елагин Г.Д., Куклина Г.В., Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Еремкин А.В., Ипатов С.С., Зиганшин Э.Р. Разработка иммуноферментных моноклональных тест-систем для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 3:60–65. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-60-65

A.A. Kytmanov, G.D. Elagin, G.V. Kuklina, D.V. Pechenkin, O.O. Fomenkov, A.V. Eremkin,
S.S. Ipatov, E.R. ZiganshinDevelopment of Immuno-Enzymatic Monoclonal Tests-Systems for the Detection
of Glanders and Melioidosis AgentsAffiliated Branch of the Federal State Budgetary Institution «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense
of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was the development of immune-enzymatic monoclonal test-kit for detecting glanders and melioidosis agents. **Materials and methods.** We used microbial cultures and hybrid cell lines obtained from the collection of the «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Hybridoma cells were incubated in the peritoneal cavity of BALB/c mice. Preparations of glanders and melioidosis monoclonal antibodies were isolated from the ascetic fluids through precipitation with ammonium sulfate and purification by means of ion-exchange chromatography. Specific components of the test-kits were subjected to freeze drying in corresponding protective media. Study of diagnostic properties of the developed test systems was performed using ELISA. **Results and conclusions.** We have obtained preparations of monoclonal antibodies *in vivo*, as well as isolated and purified immunoglobulins from ascetic fluids. We also selected the pairs of monoclonal antibodies for manufacturing specific components. Experimental series of immune-enzymatic monoclonal test-systems allowing for specific detection of glanders and melioidosis causative agents in concentrations ranging from $0.5 \cdot 10^6$ CFU/ml and higher were made. The absence of cross-reactivity with closely related saprophytes and heterologous microorganisms in concentrations of $1,0 \cdot 10^8$ CFU/ml was shown. Demonstrated was the possibility in principle to differentiate between *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* using ELISA. Test systems are promising for follow up state registration as medical products for *in vitro* diagnostics.

Keywords: glanders, melioidosis, monoclonal antibodies, ELISA.

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

Corresponding author: Alexey A. Kytmanov, e-mail: 23527@mil.ru.

Citation: Kytmanov A.A., Elagin G.D., Kuklina G.V., Pechenkin D.V., Fomenkov O.O., Eremkin A.V., Ipatov S.S., Ziganshin E.R. Development of Immuno-Enzymatic Monoclonal Tests-Systems for the Detection of Glanders and Melioidosis Agents. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 3:60–65. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-60-65

Received 06.06.18. Revised 18.06.18. Accepted 16.08.18.

Среди представителей рода *Burkholderia* особое место занимают *B. mallei* и *B. pseudomallei*, которые относятся к микроорганизмам второй группы патогенности (опасности), а вызываемые ими заболевания признаны самостоятельными нозологическими единицами.

В России последние вспышки сапа зарегистрированы в период Второй мировой войны. На территории СССР данная болезнь считалась полностью ликвидированной. Однако в 1985 г. сотрудниками Волгоградского научно-исследовательского противочумного института в г. Улан-Удэ Бурятской АССР выделили возбудитель сапа от ввезенной из Монголии лошади. В настоящее время эндемичными по этому заболеванию являются страны Ближнего Востока, Африки и Латинской Америки, а также Индия, Китай, Монголия, Филиппины и Северная Австралия [6].

Мелиоидоз впервые описан в 1911 г. А. Whitmore и его ассистентом С. S. Krishnaswami как подобное сапу заболевание («glanders-like») в Таиланде и Северной Австралии первые случаи мелиоидоза диагностированы в 1947 и 1950 гг. соответственно. В настоящее время в этих странах отмечаются самые высокие показатели заболеваемости, а эти два региона являются гиперэндемичными по мелиоидозу [5].

Актуальность создания эффективных средств диагностики заболеваний сапом и мелиоидозом определяется угрозой их занесения на территорию России из эндемичных стран в связи со значительным ростом транспортных связей, а также возросшими грузо- и пассажиропотоками.

Иммунологические методы исследования, в силу своей высокой чувствительности и специфичности, относительной методической простоты и невысокой себестоимости, являются эффективным способом решения задач индикации и идентификации патогенных микроорганизмов.

Современные подходы к разработке и совершенствованию иммунодиагностических средств детекции патогенов методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) базируются на широком использовании моноклональных антител (МКАТ) заданной специфичности.

Возможность применения МКАТ для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза и их дифференциации от близкородственных видов буркхольдерий показана отечественными учеными [2, 3, 4].

В Волгоградском научно-исследовательском противочумном институте в 1996–1998 гг. на основе МКАТ разработана и апробирована экспериментальная иммуноферментная тест-система для выявления гликопротеина (АГ8) в составе капсульной субстанции *B. pseudomallei*. С помощью этой тест-системы подтверждена гетерогенность штаммов *B. pseudomallei* по признаку экспрессии антигенных детерминант, в частности, по содержанию АГ8 в суточных культурах буркхольдерий [7]. В настоящее время это учреждение осуществляет коммерческую реализацию наборов реагентов для диагностики *in*

vitro, в том числе иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие мелиоидозные и сапные моноклональные для выявления соответствующих возбудителей в окружающей среде и биоматериале. За рубежом МКАТ к антигенам *B. pseudomallei* используют в ряде традиционных иммунодиагностических тестов, которые применяются в эндемичных регионах распространения инфекции для идентификации выделяемых культур буркхольдерий и их дифференциации от других представителей рода [2]. В 2011 г. опубликованы данные, полученные специалистами нескольких организаций США при участии Института Патологий Вооруженных Сил США (Armed Forces Institute of Pathology), в которых описано изучение бактерицидной активности более 100 моноклональных антител в отношении патогенных буркхольдерий [11].

Цель работы состояла в создании лабораторных образцов иммуноферментных моноклональных тест-систем для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза.

Для достижения поставленной цели представлялось необходимым решить следующие задачи: разработать препараты специфических мелиоидозных и сапных моноклональных антител; выбрать пары МКАТ, обеспечивающие наименьшую минимально выявляемую концентрацию бактерий в иммуноферментном анализе; приготовить готовые к применению лабораторные серии иммуноферментных тест-систем и оценить их диагностические возможности.

Материалы и методы

Препараты специфических моноклональных антител к антигенам возбудителя сапа получали, используя культуры гибридных клеточных линий 301E5F10, 258F12H11, 298C11E11 и 292G4D4; к антигенам возбудителя мелиоидоза – 255A6F5, 255B6E1, 253B4D4, 283B5H2 и 298E9B4. Все гибридные клеточные линии получены в филиале ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» (г. Киров). Клетки гибридом вводили внутривенно мышам линии BALB/c в дозах от 1 до 2 млн. Для поддержания роста гибридом за 10 дней до инокуляции культур гибридных клеток мышам-реципиентам в брюшную полость вводили по 0,3 мл минерального масла пристана (Sigma-Aldrich, США). Контроль приживания клеток осуществляли через 10 сут после введения. В случае развития у мышей выраженного асцита производили забор перитонеального экссудата.

Иммуноглобулины из асцитных жидкостей выделяли методом двукратного осаждения насыщенным раствором сульфата аммония с последующим диализом против 0,15 М натрия хлорида с добавлением 20 мМ фосфатного буферного раствора с рН 7,5, образовавшийся после диализа осадок удаляли центрифугированием. Раствор иммуноглобулинов фильтровали через шприцевую фильтрующую

насадку (MillexGP, Merck, Millipore, Германия) с диаметром пор 0,22 мкм. Окончательную очистку иммуноглобулинов осуществляли методом ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-сефацелом (GE Healthcare, Швеция) [1].

Синтез конъюгатов иммуноглобулинов с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) осуществляли по методу Р.К. Nakane и А.Ж. Kawaoi [8]. Рабочее разведение конъюгатов определяли методом «шахматного титрования» [1].

Постановку «сэндвич-варианта» ИФА выполняли в следующем порядке: сенсibilизация планшета (Nunc, Дания) препаратами МКАТ в 50 мМ карбонатно-бикарбонатном буферном растворе (КББ) в течение 1 ч при температуре 37 °С, трехкратная отмывка лунок фосфатно-солевым буферным раствором с добавлением 20 % Твина 20 (Sigma-Aldrich, США) (далее отмывка), инкубация взвеси микробных культур (исследуемые образцы) в течение 30 мин при температуре 37 °С, отмывка, инкубация иммуноферментного конъюгата в течение 30 мин при температуре 37 °С, отмывка, инкубация субстратно-индикаторной смеси на основе о-фенилендиамина (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре, остановка реакции 1 М раствором серной кислоты, определение оптической плотности при длине волны 492 нм (ОП₄₉₂). Результаты принимали к учету в том случае, если фоновые значения иммуноферментных конъюгатов не превышали величину ОП₄₉₂, равную 0,15. В лунках с исследуемыми образцами результат считали положительным при величине ОП₄₉₂, равной 0,3 и более.

Для приготовления готовых форм тест-систем специфические компоненты переводили в защитную среду высушивания до концентрации, в 11 раз превышающей рабочее разведение, фасовали в ампулы и лиофилизировали. Для иммуноферментного конъюгата использовали защитную среду следующего состава: 5 % сахарозы, 10 мг/мл бычьего сывороточного альбумина в 0,5 М ТРИС-НСl с рН 7,4; в качестве среды высушивания для иммуноглобулинов применяли 5 % раствор сахарозы в 0,5 М КББ с рН 9,6. Лиофилизацию специфических компонентов проводили в установке для сублимационного высушивания «АЛСУ» (ООО ОКБ «Фармбиомаш», Россия).

Оценку минимальной выявляемой концентрации (чувствительности) и специфичности тест-систем в отношении близкородственных патогенных буркхольдерий проводили с использованием микробных культур *B. mallei* (штаммы Ц-5, 10230, 11) и *B. pseudomallei* (Dalat, Duc-V, C-141), для сапной и мелиоидозной тест-систем соответственно. Для оценки специфичности тест-систем в отношении близкородственных сапрофитов и гетерологичных микроорганизмов использовали культуры: *Burkholderia cepacia* (штаммы ATCC 25416, 8237, АВ-1934, 3181, p-5812); *Pseudomonas putida* (ВКМВ-901); *Pseudomonas aeruginosa* (PQO-1); *Pseudomonas*

fluorescens (А-4125); *Bacillus anthracis* (СТИ-1, Sterne-34F2, Ихтиман); *Bacillus cereus* (96); *Bacillus megaterium* (654); *Bacillus subtilis* (36); *Brucella abortus* (544, 870, 19ВА, Tulya, C-68); *Brucella melitensis* (145, 16М, 706, ЯГ-56); *Brucella suis* (1330); *Escherichia coli* (НВ101); *Francisella tularensis* (15 НИИЭГ, 503, 543, Schu); *Legionella pneumophila* (Philadelphia-1, Pontiak, Flint); *Yersinia enterocolitica* (124, 134, 383); *Yersinia pestis* (EV); *Yersinia pseudotuberculosis* (147, 326, 681); *Vibrio cholerae* (569-В). Приготовление микробных взвесей с заданной концентрацией проводили визуально с помощью стандартных образцов мутности (ОСО 42-28-85, Россия).

Воспроизводимость результатов ИФА оценивали путем определения относительного значения вариации оптической плотности субстратно-индикаторной смеси. Расчет коэффициента вариации проводили по результатам изучения положительных и отрицательных контрольных проб для семи образцов каждой серии обеих тест-систем.

На этапах работы с животными исследования соответствовали международным этическим нормам, законодательству Российской Федерации и нормативным документам учреждения.

Результаты и обсуждение

Для выбора МКАТ, обеспечивающих специфическое выявление патогенных буркхольдерий и наиболее высокую чувствительность иммуноферментного анализа, исследованы различные комбинации антител, используемые для сенсibilизации планшетов и в составе конъюгата с пероксидазой хрена. В качестве контроля использовали смесь штаммов, взятых в равных соотношениях – *B. mallei* Ц-5, 10230, 11 и *B. pseudomallei* Dalat, Duc-V, C-141 для сапной и мелиоидозной тест-систем соответственно. Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2.

В серии предварительных экспериментов установлено, что сапные иммуноглобулины гибридных клеточных линий 292G4D4 и 301E5F10, а также мелиоидозные иммуноглобулины, полученные от линий 283B5H2 и 298E9B4, при использовании как в качестве сенситина, так и в составе конъюгата, обладают низкой специфической активностью в отношении соответствующих возбудителей, поэтому данные моноклональные антитела исключены из дальнейших исследований.

Различные сочетания моноклональных антител гибридных клеточных линий, используемые в качестве сенситина и в составе иммунопероксидазного конъюгата, позволяют выявлять микробные клетки *B. mallei* в концентрациях от $0,25 \cdot 10^6$ м.к./мл до $16,0 \cdot 10^6$ м.к./мл. При этом наибольшую чувствительность анализа обеспечивали моноклональные антитела, продуцируемые гибридной клеточной линией 258F12H11 в составе как сенситина, так и иммунопероксидазного конъюгата. Антитела, продуцируемые указанной гибридомой, использованы для изго-

Таблица 1 / Table 1

Чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении микробных клеток возбудителя сапа с использованием различных комбинаций МКАТ

Sensitivity of enzyme immunoassay in glanders microbe cell detection using various combinations of monoclonal antibodies

Наименование МКАТ, используемых для сенсibilизации планшетов	Минимальная выявляемая концентрация микробных клеток <i>B. mallei</i> с использованием иммунопероксидазного конъюгата на основе МКАТ гибридной клеточной линии ..., ·10 ⁶ м.к./мл			
	258F12H11	292G4D4	298C11E11	301E5F10
258F12H11	0,25	16,0	0,5	8,0
292G4D4	16,0	16,0	16,0	8,0
298C11E11	2,0	16,0	1,0	4,0
301E5F10	16,0	4,0	8,0	8,0

Примечание: результаты анализа являются полуколичественными

товления лабораторно-экспериментальных образцов иммуноферментной тест-системы.

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют, что минимальная выявляемая концентрация *B. pseudomallei* у всех исследуемых пар иммуноглобулинов не превышала 8,0·10⁶ м.к./мл. При этом максимальную чувствительность обеспечивало сочетание моноклональных антител гибридных клеточных линий 255A6F5 в составе сенситина и 255B6E1 в составе иммунопероксидазного конъюгата. МКАТ, продуцируемые перечисленными гибридами, использованы для комплектации лабораторно-экспериментальных образцов иммуноферментной тест-системы.

По результатам исследований изготовлено по три лабораторно-экспериментальные серии иммуноферментных моноклональных тест-систем для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза.

Комплектация разработанных тест-систем унифицирована в соответствии с аналогами, изготавливаемыми в филиале ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» (г. Киров). В их состав включены в готовом виде или в виде полуфабрикатов все иммунохимические реагенты, необходимые для постановки твердофазного иммуноферментного анализа в планшетах, за исключением дистиллированной воды. Тест-системы включали в себя следующие компоненты: иммуноглобулины (МКАТ) против антигенов сапного (мелиоидозного)

микроба; конъюгат иммунопероксидазный против антигенов сапного (мелиоидозного) микроба; взвесь убитой культуры сапного (мелиоидозного) микроба (положительный контрольный образец) с концентрацией 1 млрд м.к./мл; навеска солей для приготовления фосфатно-солевого буферного раствора; 20 % раствор твин-20; концентрат цитратно-перекисного раствора; навеска *o*-фенилендиамина; 1 М раствор серной кислоты; планшет полистироловый для постановки иммуноферментного анализа (96 лунок); инструкция по применению.

После приготовления готовых форм проведения оценка минимальной выявляемой концентрации микробных клеток, специфичности тест-систем в отношении близкородственных буркхольдерий, сапрофитов и гетерологичных микроорганизмов, а также воспроизводимости результатов анализа. Результаты определения чувствительности тест-систем представлены в табл. 3.

Представленные в табл. 3 данные свидетельствуют о том, что изготовленные иммуноферментные тест-системы позволяют специфически выявлять возбудителей сапа и мелиоидоза в концентрациях 0,5·10⁶ м.к./мл и выше, а также дифференцировать патогенные буркхольдерии представленных штаммов в концентрациях от 1,0·10⁷ м.к./мл и ниже.

При оценке специфичности установлено, что обе тест-системы не давали ложно-положительных результатов при изучении культур близкородствен-

Таблица 2 / Table 2

Чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении микробных клеток возбудителя мелиоидоза с использованием различных комбинаций МКАТ

Sensitivity of enzyme immunoassay in melioidosis microbe cell detection using various combinations of monoclonal antibodies

Наименование МКАТ, используемых для сенсibilизации планшетов	Минимальная выявляемая концентрация микробных клеток <i>B. pseudomallei</i> с использованием иммунопероксидазного конъюгата на основе МКАТ гибридной клеточной линии ..., ·10 ⁶ м.к./мл				
	255A6F5	255B6E1	253B4D4	283B5H2	298E9B4
255A6F5	1,0	0,5	1,0	2,0	8,0
255B6E1	1,0	2,0	2,0	4,0	8,0
253B4D4	1,0	1,0	2,0	4,0	8,0
283B5H2	8,0	8,0	4,0	4,0	4,0
298E9B4	8,0	8,0	1,0	8,0	4,0

Примечание: результаты анализа являются полуколичественными

Таблица 3 / Table 3

Чувствительность образцов лабораторно-экспериментальных серий иммуноферментных моноклональных тест-систем для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза

Sensitivity of samples of laboratory-experimental series of immune-enzymatic monoclonal test-systems for melioidosis and glanders agents detection

Тест-система (№ серии)	Минимальная выявляемая концентрация культуры...					
	<i>B. mallei</i> штамма..., ·10 ⁶ м.к./мл			<i>B. pseudomallei</i> штамма..., ·10 ⁶ м.к./мл		
	Ц-5	10230	11	Dalat	Duc-V	C-141
САП (0115)	0,25	0,5	0,5	100,0	10,0	10,0
САП (0215)	0,5	0,5	0,5	100,0	10,0	10,0
САП (0315)	0,5	0,25	0,5	100,0	10,0	10,0
МЕЛИОИДОЗ (0115)	10,0	10,0	10,0	0,5	0,5	0,5
МЕЛИОИДОЗ (0215)	10,0	10,0	10,0	0,5	0,5	0,5
МЕЛИОИДОЗ (0315)	10,0	10,0	10,0	0,5	0,5	0,5

Примечание: результаты анализа являются полуколичественными.

ных сапрофитов и гетерологичных бактерий в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к./мл и ниже.

По результатам изучения воспроизводимости установлено, что коэффициент вариации для положительных результатов составил 7,8 %, для отрицательных – менее 7 %.

Таким образом, в результате работы получены препараты моноклональных антител *in vivo*; из асцитных жидкостей выделены иммуноглобулины, которые фракционированы методом ионообменной хроматографии; подобраны пары моноклональных антител, обеспечивающие максимальный уровень чувствительности при использовании в составе иммуноферментного конъюгата и для сенсibilизации планшетов, перспективные для создания иммуноферментных тест-систем.

Изготовлены лабораторно-экспериментальные серии иммуноферментных моноклональных тест-систем для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза, позволяющие специфически выявлять микробные клетки *B. mallei* и *B. pseudomallei* в концентрации $0,5 \cdot 10^6$ м.к./мл, которые не давали ложноположительных результатов при исследовании близкородственных сапрофитов и гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к./мл.

Разработанные серии иммуноферментных тест-систем для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза по детекционным характеристикам не уступают параметрам зарубежных иммунодиагностических тестов на основе моноклональных антител [9, 10].

Показана принципиальная возможность проведения дифференциации *B. mallei* и *B. pseudomallei* с помощью моноклональных антител 255A6F5, 255B6E1 и 258F12H11.

Тест-системы перспективны для последующей регистрации в качестве медицинских изделий для диагностики *in vitro*.

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

Список литературы

1. Кэтти Д., редактор. Антитела. Методы. М.: Мир, 1991. Т. 1. 287 с.
2. Замарина Т.В., Храпова Н.П., Корсакова И.И., Пименова Е.В. Конструирование экспериментальной тест-системы иммуноферментной на основе моноклональных антител к антигену 200 кДа возбудителя мелиоидоза. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2014; 3:93–95.
3. Прохвятилова Е.В., Храпова Н.П. О получении моноклональных люминесцирующих иммуноглобулинов для обнаружения возбудителя мелиоидоза. В кн.: Эколого-эпидемиологический надзор за природно-очаговыми инфекциями в Северном Прикаспии. Астрахань; 1996. С. 147–8.
4. Прохвятилова Е.В. О разработке новых иммунобиологических препаратов на основе моноклональных антител к *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2003; 2: 153–8.
5. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):383–416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005.
6. Harvey S.P., Minter J.M. Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005. 44(1):91–7. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.12.002.
7. Khrapova N.P., Tikhonov N.G., Prokhvatilova Y.V. Detection of Glycoprotein of *Burkholderia pseudomallei*. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4(2):336–7. DOI: 10.3201/eid0402.980229.
8. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–91. DOI: 10.1177/22.12.1084.
9. Sudhir K. Dohre, Urmil Tuteja, Subodh Kumar Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to *Burkholderia mallei*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2016; 5(5):342–9. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.505.035.
10. Woods K.L., Boutthasavong L., NicFhogartaigh C., Lee S.J., Davong V., AuCoin D.P., Dance D.A.B. Evaluation of a rapid diagnostic test for detection of *Burkholderia pseudomallei* in the Lao People's Democratic Republic. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(7):e02002–17. DOI: 10.1128/jcm.02002-17.
11. Zhang S., Feng S.H., Li B., Kim H.Y., Rodriguez J., Tsai S., Lo S.C. *In vitro* and *in vivo* studies of monoclonal antibodies with prominent bactericidal activity against *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011; 18(5):825–34. DOI: 10.1128/CVI.00533-10.

References

1. Ketti D, editor [Antibodies. Methods. Volume 1]. Translated from English. Moscow: "Mir"; 1991. 287 p.
2. Zamarina T.V., Khrapova N.P., Korsakova I.I., Pimenova E.V. [Designing of experimental immune-enzymatic test-system on the basis of monoclonal antibodies to melioidosis agent antigen 200 kDa]. *Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta. (Bulletin of the Volgograd State Medical University)*. 2014; 3:93–5.
3. Prokhvatilova E.V., Khrapova N.P. [Concerning the obtainment of luminescent monoclonal immunoglobulins for the detection of melioidosis causative agent]. In: [Ecological-epidemiological sur-

veillance over natural focal infections in the Northern Caspian Sea region]. Astrakhan; 1996. P. 147–8.

4. Prokhvatilova E.V. [Concerning the development of new immune-biological preparations based on monoclonal antibodies to *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2003; 2:153–8.

5. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):383–416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005.

6. Harvey S.P., Minter J.M. Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005. 44(1):91–7. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.12.002.

7. Khrapova N.P., Tikhonov N.G., Prokhvatilova Y.V. Detection of Glycoprotein of *Burkholderia pseudomallei*. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4(2):336–7. DOI: 10.3201/eid0402.980229.

8. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–91. DOI: 10.1177/22.12.1084.

9. Sudhir K., Dohre, Urmil Tuteja, Subodh Kumar Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to *Burkholderia mallei*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2016; 5(5):342–9. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.505.035.

10. Woods K.L., Boutthasavong L., NicFhogartaigh C., Lee S.J., Davong V., AuCoin D.P., Dance D.A.B. Evaluation of a rapid diagnostic test for detection of *Burkholderia pseudomallei* in

the Lao People's Democratic Republic. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(7):e02002–17. DOI: 10.1128/jcm.02002-17.

11. Zhang S., Feng S.H., Li B., Kim H.Y., Rodriguez J., Tsai S, Lo S.C. *In vitro* and *in vivo* studies of monoclonal antibodies with prominent bactericidal activity against *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011; 18(5):825–34. DOI: 10.1128/CVI.00533-10.

Authors:

Кытманов А.А., Елагин Г.Д., Куikliна Г.В., Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Еремкин А.В., Ипатов С.С., Зиганшин Э.Р. Affiliated Branch of the Federal State Budgetary Institution «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Kirov, Russian Federation. E-mail: 23527@mil.ru.

Об авторах:

Кытманов А.А., Елагин Г.Д., Куikliна Г.В., Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Еремкин А.В., Ипатов С.С., Зиганшин Э.Р. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны. Российская Федерация, Киров. E-mail: 23527@mil.ru.

Поступила 06.06.18.

Отправлена на доработку 18.06.18.

Принята к публ. 16.08.18.