

DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-78-82

УДК 616.98:579.852.11

Д.В. Печенкин, О.О. Фоменков, А.В. Еремкин, Г.Д. Елагин, Г.В. Куклина, Г.В. Барамзина, С.С. Ипатов

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *BACILLUS ANTHRACIS*

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны, Киров, Российской Федерации

Цель. Создание иммуноферментной тест-системы для выявления спор *Bacillus anthracis*. **Материалы и методы.** В работе использованы штаммы из Государственной коллекции микроорганизмов филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров) и мыши линии BALB/c. Гибридизацию В-лимфоцитов и миеломных клеток SP2/0-Ag14 проводили по методике G. Kohler и C. Milstein в модификации De St. Fazekas и P. Scheidegger. Клетки гибридом культивировали в перитонеальной полости мышей линии BALB/c. Моноклональные антитела выделяли из асцитных жидкостей осаждением сульфатом аммония и очисткой ионообменной хроматографией. Исследование специфической активности супернатантов гибридом, асцитных жидкостей, очищенных моноклональных антител проводили «сэндвич»-методом иммуноферментного анализа. Специфические компоненты создаваемых тест-систем подвергали сублимационному высушиванию в соответствующих защитных средах. **Результаты и выводы.** Получены гибридные клеточные линии, продуцирующие специфические моноклональные антитела к споровым антигенам *B. anthracis*, и асцитные жидкости, из которых выделены иммуноглобулины. Подобраны оптимальные сочетания моноклональных антител в качестве сенситина и в составе иммуноферментного конъюгата. Наибольшую чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении споровых антигенов сибиреязвенного микроба обеспечила пара сенситин–конъюгат: 272E10G1–272F7A10. Определена оптимальная концентрация иммуноглобулинов для сенсibilизации планшета. Разработана иммуноферментная тест-система для выявления спор *B. anthracis* с пределом обнаружения $5,0 \cdot 10^5$ спор/мл. Показано отсутствие перекрестных реакций с близкородственными сапрофитами и гетерологичными микроорганизмами в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к./мл.

Ключевые слова: сибирская язва, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ.

Корреспондирующий автор: Печенкин Денис Валериевич, e-mail: 23527@mail.ru.

Для цитирования: Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Еремкин А.В., Елагин Г.Д., Куклина Г.В., Барамзина Г.В., Ипатов С.С. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления *Bacillus anthracis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2018; 3:78–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-78-82

D.V. Pechenkin, O.O. Fomenkov, A.V. Eremkin, G.D. Elagin, G.V. Kuklina, G.V. Baramzina, S.S. Ipatov

Development of Enzyme-Immunoassay for *Bacillus anthracis* DetectionBranch of the «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to develop enzyme-immunoassay test-kit for the detection of *Bacillus anthracis* spores. **Materials and methods.** Microbial cultures from the State Collection of Microorganisms at the premises of Affiliated Branch of the «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation and BALB/c mice were used in the research. Hybridization of B-lymphocytes with SP2/0-Ag14 myeloma cells was performed according to G. Kohler and C. Milstein procedure in De St. Fazekas and P. Scheidegger modification. Hybridomas were cultured in the peritoneal cavity of BALB/c mice. Ascitic fluids were isolated from mice, precipitated with ammonium sulfate and purified by means of ion-exchange chromatography for preparation of monoclonal antibodies. Specific activity of hybridoma's supernatants, ascitic fluids, purified monoclonal antibodies was studied by «sandwich» ELISA. Specific components of test-kit were lyophilized in suitable cryoprotective medium. **Results and conclusions.** We have obtained new hybrid cell lines producing specific monoclonal antibodies against *Bacillus anthracis* spore antigens and ascitic fluids from which immunoglobulins were isolated. Optimum combinations of monoclonal antibodies as a sensitizer and a component of immunoperoxidase conjugates have been selected. Monoclonal antibodies 272E10G1-272F7A10 provide the highest sensitivity of ELISA for the detection of anthrax microbe spore antigens. Our enzyme-immunoassay test allows for identification of *Bacillus anthracis* spores in concentrations up to $5,0 \cdot 10^5$ spores per milliliter. No cross reaction with closely related saprophytes and other heterologous microorganisms in concentrations of $1,0 \cdot 10^8$ CFU per milliliter is observed.

Keywords: anthrax, monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay.

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

Corresponding author: Denis V. Pechenkin, e-mail: 23527@mail.ru.

Citation: Pechenkin D.V., Fomenkov O.O., Eremkin A.V., Elagin G.D., Kuklina G.V., Baramzina G.V., Ipatov S.S. Development of Enzyme-Immunoassay for *Bacillus anthracis* Detection. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 3:78–82. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-78-82

Received 06.06.18. Revised 19.06.18. Accepted 16.08.18.

Сибиреязвенная инфекция остается актуальной проблемой. Это обусловлено периодически возника-

ющими эпизоотическими вспышками, а также наличием на территории Российской Федерации много-

численных захоронений павших от сибирской язвы животных. Крупнейшая за последнее время вспышка зарегистрирована в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г., в ходе которой диагностировано 36 случаев заболевания людей, в том числе один с летальным исходом. Наибольшую опасность представляют споры сибирской язвы, которые способны неопределенно долго пребывать в почве, служащей резервуаром инфекции. Заражение происходит преимущественно в результате контакта с больными животными, их трупами или продуктами животноводства [1, 6].

В связи с высокой актуальностью вопросов специфической индикации сибиреязвенных бацилл в России и в мире в целом активно ведутся работы по совершенствованию существующих, а также разработке новых средств и методов выявления *B. anthracis* [4, 7, 13]. Широкое применение находят иммуноферментные наборы реагентов, используемые в настоящее время в лабораторной практике и доказавшие свою надежность и эффективность. Для создания современных средств иммунодиагностики часто используются моноклональные антитела (МКАТ), применение которых значительно повышает чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов анализа.

В рамках настоящей работы проведен комплекс исследований по получению специфических МКАТ к споровым антигенам *B. anthracis*, созданию на их основе иммуноферментной тест-системы для выявления возбудителя сибирской язвы, а также ее лабораторно-экспериментальному изучению.

Материалы и методы

При получении гибридом-продуцентов моноклональных антител к споровым антигенам сибиреязвенного микроба проводили иммунизацию мышей линии BALB/c путем подкожного введения животным сорбированной на геле гидроокиси алюминия смеси спор *B. anthracis* штаммов СТИ-1, Ихтиман, Sterne-34F2, ГИЭВ-III, трехкратно в возрастающих дозах ($2,0 \cdot 10^8$; $4,0 \cdot 10^8$; $8,0 \cdot 10^8$ спор на животное) с интервалом 21 день. Заключительную иммунизацию осуществляли внутрибрюшинным введением 800 млн спор вышеуказанной смеси штаммов *B. anthracis* в 0,9 % растворе натрия хлорида через 20 дней после окончания циклической схемы иммунизации.

Гибридизацию В-лимфоцитов мышей линии BALB/c и клеток миеломы SP2/0-Ag14 проводили на четвертые сутки после заключительной иммунизации по методике G. Kohler и C. Milstein [10] в модификации De St. Fazekas и P. Scheidegger [9] с использованием 50 % раствора полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1450 (Sigma-Aldrich, США).

Скрининг первичных гибридных культур проводили трижды, начиная с 10-х суток после гибридизации, с интервалом три дня в «сэндвич»-варианте им-

муноферментного анализа (ИФА). Для тестирования использовали 96-луночные планшеты (Nunc, Дания), сенсibilизированные спорами *B. anthracis* в концентрации $3,0 \cdot 10^7$ спор в 1 мл в 50 мМ карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ) с pH 9,6, кроме того, второе и третье тестирование всех позитивных культур проводили с использованием гетерологичных сапрофитов *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, взятых в концентрации 100 млн спор в 1 мл. Супернатанты исследуемых гибридных клеток вносили в сенсibilизированные лунки планшетов в объеме 100 мкл. В рабочем разведении применяли конъюгат кроличьих иммуноглобулинов с пероксидазой хрена против иммуноглобулинов мыши (Sigma-Aldrich, США). В качестве субстрата использовали о-фенилендиамин (Sigma-Aldrich, США). Оптическую плотность измеряли на фотометре Multiskan (Labsystems, США) при длине волны 492 нм (ОП₄₉₂). Пробу считали положительной, если ОП₄₉₂ в лунке с исследуемыми пробами в два и более раза превышала ОП₄₉₂ раствора в лунке с отрицательным контролем.

Клонирование культур гибридных клеток проводили методом лимитирующих разведений из расчета одна клетка на лунку. Продуцирующую активность отдельных клонов определяли методом ИФА («сэндвич»-вариант), начиная с 10-х суток дважды с интервалом в три дня.

Для получения асцитных жидкостей мышам гистосовместимой линии интраперитонеально вводили клонированные гибридные клетки в дозе 2 млн клеток на животное. Для поддержания роста гибридом за 10 дней до инокуляции культур гибридных клеток мышам-реципиентам внутрибрюшинно вводили по 0,3 мл минерального масла пристана (Sigma-Aldrich, США). Извлечение асцитной жидкости, содержащей МКАТ, проводили на 15–20 сут. Иммуноглобулины из асцитных жидкостей выделяли путем осаждения 40 % раствором сульфата аммония с последующей очисткой методом ионообменной хроматографии [2].

Синтез конъюгатов МКАТ с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) осуществляли методом периодатного окисления [12]. Рабочее разведение конъюгатов определяли методом «шахматного титрования» [2]. Субкласс иммуноглобулинов устанавливали методом иммунохроматографического анализа с использованием набора для изотипирования IsoQuick (Sigma-Aldrich, США), а концентрацию белка в очищенных препаратах иммуноглобулинов – по методу Лоури [11].

С целью выбора препаратов МКАТ, обеспечивающих наибольшую чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении споровых антигенов *B. anthracis*, в качестве сенситина и основы для приготовления иммунопероксидазного конъюгата опробованы различные комбинации специфических иммуноглобулинов, продуцируемых полученными гибридными клонами. Для этого планшет сенсibilизировали очищенными МКАТ к споровым анти-

генам сибиреязвенного микроба в концентрации 20,0 мкг/мл в 50 мМ КББ с pH 9,6. После отмывки в лунки планшета вносили микробные культуры *B. anthracis* в концентрации от $8,0 \cdot 10^6$ спор в 1 мл и проводили двукратное разведение до концентрации $6,25 \cdot 10^4$ спор/мл. На следующем этапе, после отмывки, вносили приготовленные иммунопероксидазные конъюгаты в рабочем разведении. Реакцию учитывали определением оптической плотности при длине волны 492 нм через 20 мин после внесения субстратно-индикаторной смеси. Результат считали положительным, если ОП₄₉₂ в лунках с исследуемыми пробами превышала величину 0,3. При этом фоновые значения иммунопероксидазных конъюгатов не должны превышать величину ОП₄₉₂ равную 0,15.

Для определения оптимальной концентрации иммуноглобулинов для сенсибилизации в лунки планшета вносили раствор МКАТ в 50 мМ КББ в концентрации от 20,0 мкг/мл до 0,625 мкг/мл с шагом два. Планшет инкубировали в течение 60 мин при температуре 37 °С.

Для приготовления готовых форм иммуноферментных 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 среду высушивания, состоящую из 10 % сахарозы, 5,0 мг/мл нормальных мышинных иммуноглобулинов в 0,5 М ТРИС-НСl с pH 7,4. В качестве защитной среды высушивания для иммуноглобулинов применяли 5 % раствор сахарозы в 0,5 М КББ с pH 9,6. Лиофилизацию проводили на установке для сублимационного высушивания «АЛСУ» (ООО ОКБ «Фармбиомаш», Россия).

Оценку минимальной выявляемой концентрации (чувствительности) проводили с использованием микробных культур *B. anthracis* штаммов СТИ-1, 55-ВНИИВВиМ, Ихтиман, Sterne-34F2, ГИЭВ-III и Ч-7. Для оценки специфичности тест-систем в отношении гетерологичных микроорганизмов использовали культуры: *Bacillus cereus* (2 штамма), *Bacillus subtilis* (2), *Bacillus megaterium* (2), *Burkholderia mallei* (3), *Burkholderia pseudomallei* (3), *Brucella abortus* (4), *Brucella melitensis* (2), *Brucella suis* (2), *Escherichia coli* (1), *Francisella tularensis* (3),

Legionella pneumophila (3), *Yersinia enterocolitica* (3), *Yersinia pestis* (1), *Yersinia pseudotuberculosis* (3), *Vibrio cholerae* (1) в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к./мл.

Концентрацию спор *B. anthracis* определяли подсчетом в камере Горяева [3, 5].

Приготовление микробных взвесей с заданной концентрацией проводили визуально с помощью отраслевых стандартных образцов мутности (ОСО 42-28-85, Россия).

Работы с лабораторными животными проводились в соответствии с международными этическими нормами, законодательством Российской Федерации и нормативными документами учреждения.

Результаты и обсуждение

В ходе исследований проведено два эксперимента по гибридизации клеток мышинной миеломы и В-лимфоцитов иммунизированных мышей гистосовместимой линии. В результате тестирования гибридных культур выявлено 149 первично-позитивных гибридных линий клеток, продуцирующих антитела к споровым антигенам возбудителя сибирской язвы. Из дальнейшей работы исключено 136 клеточных культур (91,3 %), дающих перекрестную реакцию с гетерологичными сапрофитами. Из оставшихся клонировали три первичные культуры с лучшими ростовыми и секреторными свойствами. Характеристики МКАТ, полученных в результате культивирования клонов гибридных клеточных линий *in vitro* и *in vivo*, представлены в табл. 1.

Полученные МКАТ характеризовались титрами антител в ИФА в культуральной и асцитной жидкостях на уровне 1:1280–1:2560 и 1:320000–1:1280000 соответственно. Специфическая активность в препаратах иммуноглобулинов находилась на уровне титров антител в ИФА 1:640000 и выше, а концентрация белка – на уровне 8,6 мг/мл и более.

Результаты исследований по экспериментальному выбору моноклональных антител для сенсибилизации планшетов и использования в составе иммунопероксидазных конъюгатов представлены в табл. 2.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что различные сочетания МКАТ гибридных клеточных линий 272E10G1, 272F7A10, 278H4A7, используемые для сенсибилизации планшетов и в составе иммунопероксидазного конъюгата, позволя-

Таблица 1 / Table 1

Характеристики моноклональных антител к споровым антигенам *B. anthracis*

Characteristics of monoclonal antibodies to spore antigens of *B. anthracis*

Наименование МКАТ	Титр антител в ИФА в культуральной жидкости	Титр антител в ИФА в асцитной жидкости	Субкласс иммуноглобулинов	Титр антител в ИФА в препаратах иммуноглобулинов	Концентрация белка в препаратах иммуноглобулинов, мг/мл
272E10G1	1:2560	1:1280000	G ₁	1:3200000	17,0
272F7A10	1:1280	1:320000	G ₁	1:640000	8,6
278H4A7	1:2560	1:640000	G _{2a}	1:3200000	15,3

Примечание: в таблице представлены медианы титров антител (n=5)

Таблица 2 / Table 2

Данные по различным сочетаниям моноклональных антител при выявлении *B. anthracis* штамма СТИ-1, полученные в результате проведения иммуноферментного анализа

The data on various combinations of monoclonal antibodies in case of *B. anthracis* STI-1 indication based on enzyme immunoassay

Наименование МКАТ, используемых для сенсibilизации планшетов	Минимальная выявляемая концентрация микробной культуры <i>B. anthracis</i> штамма СТИ-1, с использованием иммунопероксидазного конъюгата на основе МКАТ гибридной клеточной линии ..., $\cdot 10^5$ спор в 1 мл		
	272E10G1	272F7A10	278H4A7
272E10G1	10,0	1,25	2,5
272F7A10	5,0	10,0	2,5
278H4A7	10,0	10,0	20,0

Примечания: результаты анализа являются полуколичественными; в таблице представлены медианы минимальных выявляемых концентраций (n=5).

ют методом ИФА выявлять споровые антигены вакцинного штамма СТИ-1 сибирезвездного микроба в концентрации $1,25 \cdot 10^5$ спор в 1 мл и более. Пары «сенситин–конъюгат», обеспечивающие в ИФА наибольший порог чувствительности, изучены с расширенной панелью штаммов возбудителя сибирской язвы. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 3.

В результате проведенных исследований установлено, что наибольшую чувствительность ИФА при выявлении различных штаммов *B. anthracis* обеспечивает пара сенситин–конъюгат: 272E10G1–272F7A10. Продуцируемые этими гибридами антитела использованы в качестве специфических компонентов при конструировании иммуноферментной тест-системы.

В результате определения влияния сенсibilизирующей дозы МКАТ на чувствительность и воспроизводимость ИФА установлено, что оптимальная концентрация иммуноглобулинов для сенсibilизации планшета в течение одного часа при температуре 37°C составляет 5,0 мкг/мл.

На специально оборудованной аппаратурно-

технологической линии был осуществлен выпуск трех лабораторных серий тест-системы для выявления *B. anthracis* и проведено ее лабораторно-экспериментальное изучение. При оценке чувствительности и специфичности образцов тест-системы различных серий установлено, что она обеспечивает выявление различных штаммов сибирезвездного микроба в концентрации $1,25 \cdot 10^5$ спор в 1 мл и более, при этом не дает ложноположительных результатов при изучении культур гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к./мл.

Таким образом, в результате проведенных исследований, реализован комплекс мероприятий по получению моноклональных антител к споровым антигенам возбудителя сибирской язвы. Разработана иммуноферментная тест-система для выявления спор *B. anthracis*, которая по своим индикаторным характеристикам не уступает отечественным и зарубежным аналогам на основе моноклональных антител [5, 8].

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

Таблица 3 / Table 3

Чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении споровых антигенов возбудителя сибирской язвы

Sensitivity of enzyme-linked immunoassay in case of *B. anthracis* spore antigens detection

Наименование МКАТ, используемых для сенсibilизации планшетов	Наименование МКАТ в составе иммунопероксидазного конъюгата	Минимальная выявляемая концентрация микробной культуры <i>B. anthracis</i> штамма ..., $\cdot 10^5$ спор в 1 мл				
		55-ВНИИВВиМ	Ихтиман	Sterne-34F2	ГИЭВ-III	Ч-7
272E10G1	272F7A10	1,25	1,25	2,5	1,25	5,0
	278H4A7	2,5	2,5	2,5	2,5	5,0
272F7A10	278H4A7	1,25	1,25	5,0	2,5	10,0

Примечания: результаты анализа являются полуколичественными; в таблице представлены медианы минимальных выявляемых концентраций (n=5).

Список литературы

- Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Буравцева Н.П. Современная ситуация по сибирской язве в России и мире. Основные тенденции и особенности. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 1:65–71. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-65-71.
- Кэти Д., редактор. Антитела. Методы. М.: Мир; 1991. Т. 1. 287 с.
- Нетрусов А.И., редактор. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. М.: Издательский центр «Академия»; 2005. 608 с.

- Онищенко Г.Г., Кожухов В.В., редакторы. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки медицинских средств защиты. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2010. 424 с.

- Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

- Павлов Д.Л., Онучина Н.В., Кузнецовский А.В., Фоменков О.О., Туманов А.С. Результаты исследования биологических и генетических свойств сибирезвездных изолятов эпизоотии 2016 года в Ямало-Ненецком автономном округе. *Вестник войск РХБ защиты*. 2017; 1(1):23–32.

7. Терешкина Н.Е., Девдариани З.Л. Современное состояние проблемы иммунодетекции возбудителя сибирской язвы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008; 1:44–8.

8. Bartholomew R.A., Ozanich R.M., Arce J.S., Engelmann H.E., Heredia-Langner A., Hofstad B.A., Hutchison J.R., Jarman K., Melville A.M., Victry K.D., Bruckner-Lea C.J. Evaluation of Immunoassays and General Biological Indicator Tests for Field Screening of *Bacillus anthracis* and Ricin. *Health Secur*. 2017; 15:81–95. DOI: 10.1089/hs.2016.0044.

9. Fazekas de St. Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980; 35:1–21.

10. Köhler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256(5517):495–7.

11. 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.

12. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugated. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–1091.

13. Wang D.-B., Yang R., Zhang Z.-P., Bi L.-J., You X.Y., Wei H.P., Zhou Y.F., Yu Z., Zhang X.E. Detection of *B. anthracis* spores and vegetative cells with the same monoclonal antibodies. *PLoS ONE*. 2009; 4(11): e7810. DOI: 10.1371/journal.pone.0007810.

References

1. Yermenko E.I., Ryazanova A.G., Buravtseva N.P. [Current situation on anthrax in Russia and in the world. Main trends and features]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 1:65–1. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-65-71.

2. Ketti D., editor. [Antibodies. Methods]. Moscow: “Mir”, 1991. Vol. 1. 287 p.

3. Netrusov A.I., editor. [Workshop on microbiology: Textbook for students of Higher Educational Institutions]. Moscow: «Academia»; 2005. 608 p.

4. Onischenko G.G., Kozhukhov V.V., editors. [Anthrax: relevant problems of elaboration of medical means of protection]. Moscow: Open Joint Stock Company «Publishing house «Medicine»; 2010. 424 p.

5. Onishchenko G.G., Kutryev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice guidelines]. M.: CJSC «Shiko»; 2013. 560 p.

6. Pavlov D.L., Onuchina N.V., Kuznetsovsky A. V., Fomenkov O.O., Tumanov A. S. [Results of the study of biological and genetic

properties of anthrax isolates obtained during epizooty, 2016 in the Yamal-Nenets Autonomous District]. *Vestnik Voisk Radiatsionnoi, Khimicheskoi i Biologicheskoi Zashchity*. 2017; 1(1):23–32.

7. Tereshkina N.E., Devdariani Z.L. [Present status of the anthrax pathogen immunodiagnosis]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2009; 1(95): 44–8.

8. Bartholomew R.A., Ozanich R.M., Arce J.S., Engelmann H.E., Heredia-Langner A., Hofstad B.A., Hutchison J.R., Jarman K., Melville A.M., Victry K.D., Bruckner-Lea C.J. Evaluation of Immunoassays and General Biological Indicator Tests for Field Screening of *Bacillus anthracis* and Ricin. *Health Secur*. 2017; 15:81–95. DOI: 10.1089/hs.2016.0044.

9. Fazekas de St. Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980; 35:1–21.

10. Köhler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256(5517):495–7.

11. 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.

12. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugated. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–1091.

13. Wang D.-B., Yang R., Zhang Z.-P., Bi L.-J., You X.Y., Wei H.P., Zhou Y.F., Yu Z., Zhang X.E. Detection of *B. anthracis* spores and vegetative cells with the same monoclonal antibodies. *PLoS ONE*. 2009; 4(11): e7810. DOI: 10.1371/journal.pone.0007810.

Authors:

Pechenkin D.V., Fomenkov O.O., Eremkin A.V., Elagin, G.D., Kuklina G.V., Baramzina G.V., Ipatov S.S. Branch of the «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Kirov, Russian Federation. E-mail: 23527@mil.ru.

Об авторах:

Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Еремкин А.В., Елагин Г.Д., Кукулина, Г.В. Барамзина Г.В., Ипатов С.С. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, Киров. E-mail: 23527@mil.ru.

Поступила 06.06.18.

Отправлена на доработку 19.06.18.

Принята к публ. 16.08.18.