

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 616.9-078:60

Оригинальные статьи

Научно-методические разработки биотехнологий производства иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний и детекции их возбудителей

И.С. Тюменцева, И.В. Жарникова, Е.Н. Афанасьев, В.И. Ефременко, О.И. Коготкова, С.М. Кальной, А.Н. Куличенко

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Scientific and methodical development of biotechnological production of immunobiological preparations for instant diagnosis of infectious diseases and detection of pathogens

I.S. Tyumentseva, I.V. Zharnikova, E.N. Afanasiev, V.I. Efremenko, O.I. Kogotkova, S.M. Kalnoy, A.N. Kulichenko

Stavropol Research Anti-Plague Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Stavropol, Russia

Представлены научно-методические разработки биотехнологий производства компонентов тест-систем (диагностических препаратов) для экспресс-диагностики чумы, бруцеллеза, туляремии, сибирской язвы, холеры. Для этого, прежде всего, были отработаны эффективные методики получения полноценных антигенных комплексов, применяемых для иммунизации животных в целях получения высокоактивных иммунных сывороток. Полученные иммунные сыворотки были использованы при определении оптимальных параметров производства на их основе диагностикумов. Приведены методические основы конструирования магньоиммосорбентов для селективного концентрирования возбудителей инфекционных заболеваний и их индикации экспресс-методами. Кроме того, приведена разработка пьезокварцевых биосенсорных устройств для выявления возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии в гравиметрическом проточно-инжекционном анализе, позволяющих быстро реализовать процесс достоверного распознавания исследуемого патогена в образовавшемся комплексе антиген-антитело.

Ключевые слова: чума; бруцеллез; туляремия; сибирская язва; холера; антиген; иммунная сыворотка крови; реакция не-прямой гемагглютинации; иммуноферментный анализ; полимеразная цепная реакция; магньоиммосорбент; пьезокварцевые биосенсорные устройства.

Библиографическое описание: Тюменцева ИС, Жарникова ИВ, Афанасьев ЕН, Ефременко ВИ, Коготкова ОИ, Кальной СМ, Куличенко АН. Научно-методические разработки биотехнологий производства иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний и детекции их возбудителей. Биопрепараты 2015; (4): 21–25.

The present article describes the scientific and methodological development of biotechnological manufacture of test-system components (diagnostic preparations) for instant diagnosis of plague, brucellosis, tularemia, anthrax, cholera. In this regard, in the first place the effective methods for obtaining complete antigenic complexes used for immunizing animals for the purpose of developing highly potent immune sera have been established. These antisera were used in determining optimum parameters of manufacture on the basis of their diagnosticums. Methodical basis of developing magnetic immunosorbents for selective concentration of infectious agents and their instant diagnosis methods has been mentioned. Moreover, the article describes the development of piezoelectric quartz crystal biosensors to detect plague, brucellosis and tularemia pathogens by gravimetric flow injection analysis, allowing to quickly implement the process of reliable identification of a test pathogen in antigen-antibody complex.

Key words: plague; brucellosis; tularemia; anthrax; cholera; antigen; immune serum; indirect hemagglutination reaction; immunosorbent assay; polymerase chain reaction; magnesium immunosorbent; piezoelectric quartz crystal biosensor.

Bibliographic description: Tyumentseva IS, Zharnikova IV, Afanasiev EN, Efremenko VI, Kogotkova OI, Kalnoy SM, Kulichenko AN. Scientific and methodical development of biotechnological production of immunobiological preparations for instant diagnosis of infectious diseases and detection of pathogens. Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (4): 21–25.

ВОЗ уделяет большое внимание качеству иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), что отражено в разработанных требованиях к производству и контролю отдельных иммунобиологических препаратов. Современное произ-

водство ИЛП представляет собой единую биотехнологическую систему, которая складывается из последовательных стадий и операций, количество и особенности которых зависят от вида производимой продукции.

Цель настоящей работы – научно-методические разработки биотехнологий производства ИЛП для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний и детекции их возбудителей (чумы, бруцеллеза, туляремии, сибирской язвы, холеры). Задачи исследований: отработка эффективной методики извлечения полноценных антигенных комплексов из взвесей бактериальных культур, подбор иммуномодуляторов и схем иммунизаций для получения высокоактивных иммунных сывороток; определение оптимальных параметров биотехнологий производства иммуноглобулинов флуоресцирующих, иммуноферментных конъюгатов и эритроцитарных диагностикумов; разработка методических основ конструирования магнимоносорбентов (МИС) для селективного концентрирования возбудителей инфекционных заболеваний и их индикации в экспрессных методах (иммуноферментном анализе (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР)); отработка методики конструирования пьезокварцевых биосенсоров.

Материалы и методы

Контроль титра специфических антител в сыворотках крови определяли в непрямой реакции иммунофлуоресценции (НРИФ) по методу T.H. Weller, A.H. Coons [1]. Прямой метод окраски препаратов осуществляли по A.H. Coons, M.H. Kaplan [2]. Рабочий титр и специфическую активность иммуноферментных конъюгатов определяли по методике, изложенной M. Clark и A. Adams [3] в «сэндвич»-варианте ИФА. Суммарный объем и радиус пор магносорбентов определяли по методу Н.В. Кельцева [4]. Анализ антигенного состава микроорганизмов и качества полученных иммунных сывороток проводили в реакции иммунодиффузии в 1% агаровом геле по O. Ouchterlony [5]. В качестве основной матрицы магносорбентов использовали алюмосиликат (ТУ 6-09-01-356-76) и магнитный порошок (окись железа(III), ГОСТ 4173-77). Модификатор – полиглиокин Красноярского производства, активирующий реагент – натрия перхлорат (ТУ 6-09-3582-74).

В качестве датчиков при создании пьезокварцевых биосенсоров (ПБ) использовали пьезокварцевые резонаторы (ПКР) (10 МГц) с золотыми электродами (ЗАО «ЭТНА», Москва). Измерения параметров проводили на установке «СРНА-330» (ЗАО «ЭТНА», Москва). Для подтверждения воспроизводимости и достоверности результатов, полученных при исследовании, применяли статистические методы [6].

Результаты и обсуждение

Основным биологическим сырьем при производстве ИЛП являются специфические антигены, выделенные из микробных биомасс, и иммунные сыворотки крови, полученные на их основе. При многообразии способов извлечения специфических антигенов из микробных клеток необходим комплекс последовательных манипуляций, который бы позволил изолировать полноценные в антигенном отношении фракции для производственных целей. В связи с этим мы остановили свой выбор на водно-солевых экстрактах. Это обосновано тем, что данные исследователей [7] показывают, что такие экстракты обладают сложным макромолекулярным составом, и в них обнаруживаются большинство выявляемых у бактерий анти-

генов. Водорастворимые чумные, бруцеллезные, туляремийные, сибиреязвенные антигены изолировали комплексным методом: водно-солевой экстракцией, ультразвуковой дезинтеграцией, осаждением белковых фракций сульфатом аммония. Выход белковых фракций составил не менее 5 мг/мл. Опыт получения белковых антигенов подтвердил высокую эффективность подобранной схемы извлечения комплекса водорастворимых биополимеров при сохранении их активности.

Для получения иммунных сывороток нами апробированы различные схемы иммунизации, которые отличались способом и количеством вводимого антигена, интервалами между инъекциями, кратностью введения, а также адьювантами или иммунокорректорами (полный и неполный адьювант Фрейнда, арлацель, ланолин-вазелиновая смесь, циклофосфан, феракрил, тималин). Из адьювантов наиболее эффективным оказался полный адьювант Фрейнда, традиционно используемый при иммунизации животных. Общими недостатками схем иммунизации с применением адьювантов являются: трудность создания стойкой эмульсии «вода в масле», длительность, травматичность для животных, связанная с возникновением адьювантной болезни у экспериментальных животных.

Применение иммунокорректоров (тималина, циклофосфана, феракрила) позволило значительно сократить сроки иммунизации и расход антигенного материала при повышении титров специфических антител практически у 100% животных, взятых в опыт, при полной атравматичности для них.

Для получения гипериммунных сывороток наиболее приемлемой оказалась схема с использованием феракрила в сочетании с комплексом антиген–антитело (Аг–Ат), который инъецировали животным на определенном этапе: грунديمмунизация включала пять последовательных парентеральных введений смеси антигена с 3% водно-спиртовым раствором феракрила с интервалами в 3–7 сут. Через 30 сут после последней инъекции антигена у животных брали кровь, получая не менее 4 мл иммунной сыворотки, в которую добавляли антиген с целью получения комплекса Аг–Ат. Основной цикл иммунизации состоял из четырех внутривенных инъекций комплекса Аг–Ат через каждые 3–4 сут тому же животному, от которого была получена иммунная сыворотка. Специфические титры антител в этих сыворотках достигали в реакции иммунодиффузии (РИД) – 1:28,8±2,5–1:53,3±5,01, что удовлетворяло требованиям оценки сырья для дальнейшего получения диагностических препаратов [8].

При получении агглютинирующих сывороток оптимальной оказалась схема, в которой использованы вещества с иммуностропной активностью, обладающие разными механизмами действия (тималин и циклофосфан). Антигенный материал пятикратно вводили внутривенно, одновременно внутримышечно инъецировали тималин, в третью инъекцию дополнительно вводили внутримышечно циклофосфан. Эта схема дала возможность заменить живые вирулентные штаммы микроорганизмов, традиционно используемые при производстве агглютинирующих диагностических сывороток в качестве антигенов, на водорастворимые белковые антигены, что позволило полностью исключить возможность инфицирования персонала. Агглютинирующие сыворотки, полученные таким способом, по титрам агглютининов и специфичности не уступали аналогичным

коммерческим препаратам и с успехом были использованы при конструировании ИЛП.

Способы выделения из иммунных сывороток иммуноглобулинов класса G (IgG), часто используемых при конструировании ИЛП, отличаются эффективностью и разнообразием. Наиболее производительными являются следующие: фракционирование сульфатом аммония, полиэтиленгликолем (ПЭГ) и каприловой кислотой. Как показала наша сравнительная оценка этих методов, каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. Так, общим преимуществом является возможность осуществлять эту операцию при комнатной температуре, не опасаясь денатурации белка. На преципитацию иммуноглобулинов каприловой кислотой затрачивается в 2 раза меньше времени по сравнению с остальными (2 суток против 4), при этом выделяется наиболее чистая фракция IgG. Достоинством выделения иммуноглобулинов сернокислым аммонием является возможность длительного хранения иммуноглобулинов в его растворе без потери активности [9].

При проведении конъюгации флуоресцеинизотиацианата (ФИТЦ) с IgG установлено, что лучшие иммуноглобулины флуоресцирующие получены при использовании IgG, фракционированных каприловой кислотой. Это можно объяснить тем, что в преципитате содержалось более 90% фракции IgG, а для конъюгации с ФИТЦ требовалось наименьшее количество флуорохрома (20 мг на 1 г белка) для получения оптимальных молярных отношений Мф/Мб, в связи с чем снижалась вероятность неспецифических реакций и достигалась высокая специфическая активность препаратов. В результате серии опытов по отработке параметров конъюгации IgG с ФИТЦ определены их оптимальные значения: pH реакционной смеси 9,5, температура конъюгации 20°C, 4-часовой контакт белка с красителем. Таким способом были получены экспериментальные серии чумных, бруцеллезных, сибиреязвенных, туляремийных иммуноглобулинов флуоресцирующих, характеризующихся красящим титром 1:32–1:128.

В результате проведенных исследований по получению высокоактивных и специфичных иммуноферментных конъюгатов отработан ряд параметров: эффективный метод выделения иммуноглобулинов из гипериммунных сывороток с помощью ПЭГ-6000; концентрация белка при шивке с ферментом пероксидазой хрена – 5 мг/мл, исключено применение хроматографической колонки (при этом не наблюдалось неспецифического связывания, увеличилась активность препарата на два порядка, сократился процесс получения конъюгата). Рабочий титр разработанных иммуноферментных чумных, бруцеллезных, туляремийных, холерных конъюгатов составил 1:400–1:1800. Чувствительность конъюгатов по водорастворимым антигенам – 50–100 нг/мл. Увеличена чувствительность ИФА в 4 раза в результате обработки полистироловых планшет парами бензальдегида, она составила 1×10^3 – 1×10^4 м.к./мл.

Среди серологических тестов хорошо известна реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). Причем, подходы к изготовлению эритроцитарных диагностикумов отличаются большим разнообразием. Нам удалось унифицировать биотехнологию изготовления диагностикумов эритроцитарных иммуноглобулиновых чумных, бруцеллезных, туляремийных. Наиболее эффективным конъюгирующим агентом определен 2% раствор вторичного алкилсульфата натрия при температуре 45°C; pH раствора при сенсibiliзации 5,0. Чувствительность

изготовленных диагностикумов составила $7,8 \times 10^5$ – $1,56 \times 10^6$ м.к./мл, что полностью удовлетворяет нормативной документации.

Эффективность методов индикации и выделения возбудителей инфекционных заболеваний и их антигенов может быть значительно увеличена после селективного концентрирования микробов и антигенов с отделением их от контаминирующей микрофлоры и примесей. Эта цель может быть достигнута путем применения методов иммуносорбции, особое место среди которых занимают методы с использованием сорбентов с магнитными свойствами. Магнесорбенты служат в качестве твердой фазы для селективного концентрирования на их поверхности патогенов.

Нами разработаны научно-методические основы конструирования кремнеземных аффинных сорбентов с магнитными свойствами [10, 11]. В качестве структурных единиц, формирующих остов кремнезема, использовали алюмосиликат и магнитный порошок. Модифицирование матрицы проводили полиглиукином с последующим ковалентным связыванием белкового лиганда методом окисления. На основе проведенных исследований рекомендованы следующие условия получения кремнеземных магнесорбентов (КМС): соотношение компонентов синтеза 3:2:1, соответственно Fe_2O_3 , декстран, алюмосиликат; время гелеобразования 2 ч, значение pH гелеобразования 7,0; время гелеобразования 1 ч, значение pH гелеобразования 7,0. Получены сорбенты со стандартными структурными характеристиками – удельная поверхность 58 м²/г, объем пор 1,70 см³/г, радиус пор – 42,5 нм. Разработанный синтез альдегидосодержащих КМС методом окисления натрием перхлората отличался простотой и технологичностью, активирование носителя осуществлялось в течение 1 ч. Содержание альдегидных групп (0,67 мг-экв/г) на единицу поверхности носителя обеспечивало высокую концентрацию иммобилизованного лиганда.

Преимущества полученных МИС заключается в том, что равновесие между антителами и сорбентом – не более 2 ч против 18 ч в случае использования обычных органополимерных носителей. Концентрация белка иммуноглобулинов 2,5 мг/мл является оптимальной для полного насыщения антителами сорбента в объеме 0,4 мл 10% взвеси. Установлено, что изменение pH раствора иммуноглобулинов от 5 до 9,5 не оказывает влияния на специфическую активность и чувствительность МИС, а максимальная адсорбционная емкость сорбента наблюдается при температуре (37±1)°C.

Для дальнейшего совершенствования экспрессных методов индикации возбудителей инфекционных заболеваний мы объединили метод предварительного концентрирования инфекционного агента на разработанных МИС с последующей детекцией его методом ИФА или ПЦР. Применение МИС позволяет добиться повышения эффективности анализа. Так, например, для ИФА отпадает необходимость использования полистироловых планшет, а срок годности иммобилизованной твердой матрицы, т.е. МИС, достигает 10 лет против 20 сут иммобилизованных планшет, при увеличении чувствительности (МИС+ИФА) в 1000 раз по сравнению с традиционным ИФА. Использование в ПЦР МИС позволило максимально сконцентрировать искомую ДНК и исключить отрицательное влияние на компоненты реакции всевозможных примесей, поскольку некоторые из них способны значительно сни-

жать чувствительность ПЦР за счет угнетения активности термостабильной ДНК-полимеразы.

Диагностическая ценность разработанных ИЛП и методических приемов подтверждена в экспериментах, клинических и полевых условиях, а также при эпидемических вспышках инфекционных заболеваний [12]. Все препараты успешно прошли лабораторные и комиссионные испытания. Оформлена и утверждена нормативная документация. Приоритетность разработок ИЛП подтверждена патентами РФ. На основе данных разработок выпускается 13 коммерческих и экспериментально-производственных серий ИЛП.

В настоящее время нами ведется разработка пьезокварцевых биосенсорных (ПБ) устройств для выявления возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии в гравиметрическом проточно-инжекционном анализе, позволяющих быстро реализовать процесс достоверного распознавания исследуемого патогена в образцованном комплексе антиген-антитело. Активирование ПКР проводили методом «тлеющего разряда» – низкотемпературное плазменное напыление парами бензальдегида (БА) в условиях вакуума в течение 10 с под действием УВЧ-поля мощностью 30 Дж. В результате такого воздействия образовывалось равномерное покрытие с доступными реакционно-функциональными группами для иммобилизации белковых молекул. Для иммобилизации ПКР применяли 0,5 мл IgG с концентрацией белка 125 мкг/мл. Измерение частоты проводили на установке CPNA 330, при этом частота уменьшалась на 200 и более Гц, т.е. проходила эффективная иммобилизация [13]. Иммобилизованный ПКР инкубировали с соответствующим возбудителем (чумы, бруцеллеза или туляремии), которые специфически связывались с иммобилизованными на поверхности ПКР иммуноглобулинами с образованием иммунных комплексов. В результате установлено, что чувствительность составила $1,0 \times 10^3$ – $1,0 \times 10^4$ м.к./мл. В результате проведенных экспериментов подобраны условия функционирования предлагаемых ПБ: буфер для промывки и разведения реагентов – 0,01 М ФСБ, pH 7,2±0,05, объем анализируемых проб – 0,5 мл, время отклика ПБ – 10–15 мин, частота регистрации аналитических сигналов при положительном контроле – 20 Гц и более. На основе разработанных ПБ сконструированы экспериментальные серии тест-систем пьезокварцевых биосенсорных для выявления возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии [14].

Проведенные лабораторные испытания на чистых культурах показали, что все экспериментальные серии тест-систем пьезокварцевых биосенсорных для выявления возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии в гравиметрическом анализе соответствуют требованиям, предъявляемым к диагностическим препаратам.

Выводы

1. Подобран эффективный комплекс манипуляций (водно-солевая экстракция, механическая и ультразвуковая дезинтеграция), позволяющий изолировать полноценные белковые антигенные фракции микроорганизмов и отработана производственная схема для получения иммунных сывороток с высокими титрами специфических антител, основанная на оптимальной комбинации комплекса специфических антигенов и иммуномодуляторов.

2. Определены оптимальные параметры биотехнологии производства иммуноферментных конъюгатов, иммуноглобулинов флуоресцирующих, диагностикумов эритроцитарных, позволяющие получать диагностические препараты, отвечающие требованиям, предъявляемым к индикационным препаратам.

3. Стандартизовано получение МИС, обладающих стандартностью структурных характеристик, высокой адсорбционной активностью, механической прочностью и химической устойчивостью. Разработаны методические приемы по сочетанному применению селективного концентрирования микроорганизмов на МИС с последующим проведением ИФА и ПЦР, позволяющие исследовать материал с низкой концентрацией патогена, с чувствительностью, превышающей традиционные методы.

4. Разработанные биосенсорные тест-системы для гравиметрического проточно-инжекционного анализа обладают высокой чувствительностью ($1,0 \times 10^3$ – $1,0 \times 10^4$ м.к./мл), информативностью, быстротой постановки и получения результатов анализов (15 мин).

Литература:

1. Weller TH., Coons AH. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol.* 1954; 86: 789–94.
2. Coons AH., Kaplan MH. Localisation of antigen in tissue cells. *J Exp Med.* 1950; 91(1): 81–9.
3. Clark MF, Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J Gen Virol.* 1977; 36(3): 475–83.
4. Кельцев НВ. Основы адсорбционной техники. М.: Химия; 1984.
5. Ouchterlony O. Antigen-antibody reaction in gels. *Arkiv For Kemi Mineral o Geol.* 1949; 261(14): 1–9.
6. Урбах ВЮ. Статистические методы в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина; 1975.
7. Вейнблат ВИ, Каминский ВВ, Орлова ЛС. Иммунодискэлектрофорез антигенов чумного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций* 1971; 4(26): 196–200.
8. Афанасьев ЕН. Научно-методические аспекты экспресс-диагностики возбудителей особо опасных зоонозных инфекций (чума, бруцеллез, сибирская язва): автореф. дис. ... докт. мед. наук. Ростов; 2000.
9. Афанасьев ЕН, Тюменцева ИС, Коготкова ОИ, Ляпустина ЛВ, Жарникова ИВ, Савельева ИВ. и др. Разработка новых подходов к получению гипериммунных сывороток для производства медицинских иммунобиологических препаратов. *Проблемы особо опасных инфекций* 2010; 103(1): 67–70.
10. Жарникова ИВ. Методологические подходы и разработка биотехнологии иммунобиологических препаратов для диагностики инфекционных особо опасных заболеваний и детекции их возбудителей: дис. ... д-ра биол. наук. Ставрополь; 2004.
11. Тюменцева ИС, Афанасьев ЕН, Ляпустина ЛВ, Коготкова ОИ, Жарникова ИВ, Ефременко ВИ. и др. Иммуномагнитные сорбенты для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний: аспекты биотехнологии и опыт применения. *Проблемы особо опасных инфекций* 2009; 101: 59–61.
12. Тюменцева ИС, Афанасьев ЕН, Савельева ИВ, Жарникова ИВ, Жданова ЕВ, Курчева СА. и др. Разработка тест-систем магнитоиммуносорбентных для выявления холерного вибриона в объектах окружающей среды. *Здоровье населения и среда обитания* 2014; 253(4): 17–9.
13. Кальной СМ, Жарникова ИВ, Дикова СП, Ляпустина ЛВ, Ковалев ДА, Писаренко СВ. и др. Способ получения микрогравиметрического иммуносенсора. Патент Российской Федерации, № 2510830; 2014.
14. Жарникова ИВ, Кальной СМ, Курчева СП, Жарникова ТВ, Дикова СП, Бельченко ЕА. и др. Разработка тест-систем на основе пьезоэлектрических биосенсоров и их апробация в биотехнологической практике. *Технологии живых систем* 2014; 11(4): 54–8.

References

1. Weller TH., Coons AH. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol.* 1954; 86: 789–94.
2. Coons AH., Kaplan MH. Localisation of antigen in tissue cells. *J Exp Med.* 1950; 91(1): 81–9.

3. Clark MF, Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J Gen Virol.* 1977; 36(3): 475–83.
4. Keltsev NV. *Fundamentals of adsorption technology.* Moscow: Himiya; 1984 (in Russian).
5. Ouchterlony O. Antigen-antibody reaction in gels. *Arkiv For Kemi Mineral o Geol.* 1949; 261 (14): 1–9.
6. Urbah VYu. *Statistical methods in biological and medical research.* Moscow: Meditsina; 1975 (in Russian).
7. Veynblat VI, Kaminskiy VV, Orlova LS. Immunodislectrophoresis of antigens of plague microbe. *Problemy osobo opasnyh infektsiy* 1971; 4(26): 196–200 (in Russian).
8. Afanasiev EN. *Scientific and methodological aspects of the rapid diagnosis of pathogens of dangerous zoonotic infections (plague, brucellosis, anthrax).* Dr. Med. Sci [thesis]. Rostov; 2000 (in Russian).
9. Afanasiev EN, Tyumentseva IS, Kogotkova OI, Lyapustina LV, Zharnikova IV, Savelieva IV, et al. The development of new approaches to the production of hyperimmune serum for medical immunobiological preparations. *Problemy osobo opasnyh infektsiy* 2010; 103(1): 67–70 (in Russian).
10. Zharnikova IV. *Methodological approaches and the development of biotechnology of immunobiological preparations for diagnostics of infectious especially dangerous diseases and detection of pathogens.* DrBiolSci [dissertation]. Stavropol; 2004 (in Russian).
11. Tyumentseva IS, Afanasiev EN, Lyapustina LV, Kogotkova OI, Zharnikova IV, Efremenko VI, et al. Immunomagnetic sorbents for the rapid diagnosis of dangerous infectious diseases: aspects of biotechnology and the application experience. *Problemy osobo opasnyh infektsiy* 2009; 101: 59–61 (in Russian).
12. Tyumentseva IS, Afanasiev EN, Savelieva IV, Zharnikova IV, Zhdanova EV, Kurcheva SA, et al. Development of test systems for magnoinmunosorbent isolation of *Vibrio cholerae* in the environment. *Zdorovie naseleniya i sreda obitaniya* 2014; 253(4): 17–9 (in Russian).
13. Kalnoy SM, Zharnikova IV, Dikova SP, Lyapustina LV, Kovalev DA, Pisarenko SV, et al. A method for producing microimmunogravimetric sensor. Patent of Russian Federation, № 2510830; 2014 (in Russian).
14. Zharnikova IV, Kalnoy SM, Kurcheva SP, Zharnikova TV, Dikova SP, Belchenko EA, et al. The development of test systems based on piezoelectric biosensors and their testing in the biotech practice. *Tehnologii zhiviyh sistem* 2014; 11(4): 54–8 (in Russian).

Authors:

Stavropol Research Anti-Plaque Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, 13–15 Sovetskaya st., Stavropol, 355035, Russian Federation.

Tyumentseva IS. Head of the laboratory. Doctor of Medical Sciences, professor.

Zharnikova IV. Leading Researcher. Doctor of Biological Sciences.

Afanasiev EN. Chief Researcher. Doctor of Medical Sciences, professor.

Efremenko VI. Chief Researcher. Doctor of Medical Sciences, professor.

Kogotkova OI. Leading Researcher. Doctor of Medical Sciences.

Kalnoy SM. Leading Researcher. Doctor of Medical Sciences.

Kulichenko AN. Director. Doctor of Medical Sciences, professor.

Об авторах

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Ставропольский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15.

Тюменцева Ирина Степановна. Заведующая лабораторией, д-р мед. наук, профессор.

Жарникова Ирина Викторовна. Ведущий научный сотрудник, д-р биол. наук.

Афанасьев Евгений Николаевич. Главный научный сотрудник, д-р мед. наук, профессор.

Ефременко Виталий Иванович. Главный научный сотрудник, д-р мед. наук, профессор.

Коготкова Ольга Ивановна. Ведущий научный сотрудник, д-р мед. наук.

Кальной Сергей Михайлович. Ведущий научный сотрудник, д-р мед. наук.

Куличенко Александр Николаевич. Директор, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Жарникова Ирина Викторовна; IJ-biotech@yandex.ru

Поступила 30.07.2015 г.

Принята 06.11.2015 г.