

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

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОМ-ПРОДУЦЕНТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА*Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Киров, Российская Федерация*

Цель работы. Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам возбудителя бруцеллеза. **Материалы и методы.** В работе использовали микробные культуры из Государственной коллекции микроорганизмов филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров); мыши линии BALB/c. Гибридизацию проводили по методике G.Kohler и C.Milstein в модификации De St.Fazekas и D.Scheidegger. Исследование специфической активности иммунных сывороток, супернатантов гибридом, асцитных жидкостей, препаратов моноклональных антител проводили методом непрямого иммуноферментного анализа. **Результаты и выводы.** Получены и охарактеризованы гибридомы-продуценты моноклональных антител к специфическим антигенам возбудителя бруцеллеза. Полученные гибридомы являются активными и стабильными антителопродуцентами при многократном пассировании *in vitro* и *in vivo*. Получены асцитные жидкости и приготовлены препараты бруцеллезных моноклональных антител. Проведен обоснованный выбор антител, обеспечивающих наибольшую чувствительность иммуноферментного анализа. Установлено, что моноклональные антитела, продуцируемые гибридомами 232В6Н7, 232G12F7, 233В2С5, в сочетании с бруцеллезными кроличьими иммуноглобулинами позволяют выявлять микробные клетки типовых штаммов различных видов бруцелл в концентрации от $0,25 \cdot 10^6$ до $1,0 \cdot 10^6$ м.к.·см⁻³ и не взаимодействуют с культурами гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к.·см⁻³. Гибридомы-продуценты и препараты специфических бруцеллезных моноклональных антител планируется использовать для разработки и производства средств иммунодетекции.

Ключевые слова: бруцеллез, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ.

Корреспондирующий автор: Куклина Галина Викторовна, e-mail: g.kklna@yandex.ru.

G.V.Kuklina, G.D.Elagin, O.O.Fomenkov, D.V.Pechenkin, A.V.Eremkin, A.A.Kytmanov

Manufacturing of Hybridomas-Producers of Monoclonal Antibodies to Brucellosis Agent Antigens*Affiliated Branch of the Federal State Budgetary Institution «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation*

Objective of study is to prepare hybridomas-producers of monoclonal antibodies to brucellosis agent antigens. **Materials and methods.** *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* strains from the State collection of microorganisms of the 48th Central Research Institute Affiliated Branch and BALB/c mice. Hybridization was performed as described by G.Kohler and C.Milstein in modification by Fazekas De St. and Scheidegger D. The study of specific activity of immune sera, hybridoma supernatants, ascites fluid, and monoclonal antibody preparations was performed using ELISA. **Results and conclusions.** Obtained and characterized have been hybridomas-producers of monoclonal antibodies to specific antigens of brucellosis agent. They are active and stable antibody producers in the repeated passaging both, *in vitro* and *in vivo*. Obtained have also been the ascites fluid and preparations of monoclonal antibodies of brucellosis agent. Carried out has been substantiated selection of antibodies which could provide for the most sensitive ELISA. It is established that the monoclonal antibodies produced by hybridomas 232B6H7, 232G12F7, 233B2C5 in combination with brucellosis rabbit immunoglobulins allow for the identification of microbial cells of type strains of various *Brucella* species in concentrations ranging from $0,25 \cdot 10^6$ mc·sm⁻³ up to $1,0 \cdot 10^6$ mc·sm⁻³ and gave negative results with cultures of heterologous microorganisms in the contents of $1,0 \cdot 10^8$ mc·sm⁻³. Hybridomas-producers of monoclonal antibodies are planned to be used for the construction and manufacturing of immunodetection test-systems.

Key words: brucellosis, monoclonal antibodies, ELISA.

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

Corresponding author: Galina V. Kuklina, e-mail: g.kklna@yandex.ru.

Citation: Kuklina G.V., Elagin G.D., Fomenkov O.O., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A. Manufacturing of Hybridomas-Producers of Monoclonal Antibodies to Brucellosis Agent Antigens. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 2:67–71. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-67-71

Бруцеллез – особо опасная зоонозная инфекция, характеризующаяся неопределенной продолжительностью инкубационного периода, неспецифической клинической симптоматикой с множественным поражением органов и систем организма человека, часто приводящая к инвалидизации. Человек заражается от животных главным образом контактным или контактно-бытовым путем через кожу и слизистые оболочки полости рта, носа, глаз. Алиментарный

способ заражения наблюдается в основном при употреблении в пищу непастеризованных молочных продуктов, а также воды [1, 2, 6].

Из 10 видов бруцелл заболевания людей преимущественно вызывают *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis*, реже – *B. canis*. В нашей стране причиной более чем 95–97 % случаев бруцеллеза людей является *B. melitensis*.

В России ежегодно фиксируется от 300 до 500

случаев вновь выявленного бруцеллеза. Больные бруцеллезом люди регистрируются на территории 32 субъектов Российской Федерации 7 федеральных округов. Наиболее неблагополучными являются Северо-Кавказский, Южный и Сибирский федеральные округа. В условиях действия экономических санкций по отношению к Российской Федерации вероятно переориентация как торговых сетей, так и отдельных специализированных предприятий и предпринимателей на новых поставщиков животноводческой продукции из стран Средиземноморья, Ближнего Востока, Южной Америки, являющихся эндемичными по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота, что может негативно повлиять на эпидемиологическую ситуацию по бруцеллезу в стране и привести к повышению уровня заболеваемости [2].

Согласно Методическим указаниям «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» (МУ 3.1.7.1189-03) лабораторные средства выявления возбудителя заболевания и его растворимых антигенов являются ключевым звеном в системе биологической защиты населения. Эффективность лабораторной диагностики напрямую зависит от главных требований средств обнаружения и идентификации: высокой чувствительности, специфичности и быстроты выполнения. Перечисленным требованиям отвечают такие иммунологические методы выявления возбудителей опасных инфекционных болезней, как иммуноферментный и иммунохроматографический анализы. Эффективность данных средств иммунодетекции во многом определяется качеством применяемых для их конструирования антител.

Развитие гибридной технологии и использование ее в практике иммунологических исследований послужило мощным толчком к созданию тест-систем нового поколения на основе моноклональных антител (МКАТ), обладающих абсолютной стандартизованностью и специфичностью. Они идентичны не только по изотипу, аллотипу и идиотипу, но также по аффинитету и физико-химическим характеристикам. Применение МКАТ для создания средств иммуноанализа позволяет значительно повысить их диагностические показатели.

В настоящее время в Российской Федерации отсутствуют официально зарегистрированные и разрешенные к применению иммуноферментные и иммунохроматографические тест-системы для выявления бруцеллеза на основе моноклональных антител, а имеются лишь единичные экспериментальные разработки [4, 5].

В связи с вышеизложенным, наши исследования были направлены на получение гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам возбудителя бруцеллеза и препаратов специфических бруцеллезных моноклональных антител, перспективных для конструирования иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем.

Цель работы состояла в получении гибридных клеточных линий, стабильно секретирующих имму-

ноглобулины к специфическим эпитопам антигенов возбудителя бруцеллеза и оценке перспективности их применения для выявления различных видов бруцелл.

Для достижения поставленной цели представлялось необходимым решить следующие задачи: получить гибридомы-продуценты моноклональных антител к антигенам возбудителя бруцеллеза; изучить культуральные и продуктивные свойства полученных гибридом *in vitro* и *in vivo*; получить асцитные жидкости и выделить иммуноглобулины; наработать препараты специфических бруцеллезных моноклональных антител.

Материалы и методы

Мышей линии ВАLВ/с (10 самок 5–6-недельного возраста массой 15–20 г) иммунизировали препаратом из смеси суспензий инактивированных микробных культур *B. abortus* штамма 544, *B. melitensis* штамма 145, *B. suis* штамма 513, взятых в равных концентрациях, с конечным содержанием общего количества микроорганизмов в смеси $1,2 \cdot 10^{11}$ м.к.·см⁻³, с добавлением 2,0 мг·см⁻³ геля гидроксида алюминия. Схема иммунизации включала 4 подкожные инъекции препарата с интервалом введения 21 сут. Доза препарата составила $3,0 \cdot 10^9$, $6,0 \cdot 10^9$, $1,2 \cdot 10^{10}$ и $2,4 \cdot 10^{10}$ м.к. соответственно. Через 18 дней после последней инъекции осуществляли взятие крови из параорбитального синуса и определяли титр специфических антител в «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА). Для этого планшеты сенсibilizировали антигеном, состоящим из смеси инактивированных микробных культур *B. abortus* штамма 544, *B. melitensis* штамма 145, *B. suis* штамма 513, взятых в равных концентрациях, с конечным содержанием общего количества микроорганизмов в смеси $3,0 \cdot 10^7$ м.к.·см⁻³ в 50 мМ карбонат-бикарбонатном буфере с рН 9,6 (КББ).

Животным с наибольшим уровнем продукции антител через 20 дней после иммунизации делали внутрибрюшную инъекцию (бустер-доза) смеси вышеуказанных микробных культур в количестве $1,0 \cdot 10^{10}$ м.к. На четвертые сутки с момента бустерной инъекции селезенку асептически извлекали, спленоциты получали путем перфузии средой RPMI-1640 с 20 мМ HEPES-буфера (Flow Laboratories, Великобритания).

Процедуру слияния иммунных спленоцитов и клеток миеломы SP2/0-Ag14 проводили по методике, предложенной G.Kohler и C.Milstein [9] в модификации De St.Fazekas, S.Groth и D.Scheidegger [7]. В качестве индуктора слияния клеток использовали 50 % раствор полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1450 (Sigma-Aldrich, США). Гибридные клетки культивировали *in vitro* в CO₂-инкубаторе (Labsystems, Россия) при температуре 37 °С и содержании диоксида углерода 5 %. Для культивирования использовали ростовую среду RPMI-1640 (Sigma-Aldrich,

США), содержащую 2 мМ L-глутамин, с добавлением 20 % фетальной телячьей сыворотки (Thermo Scientific, США) и 80 мг·л⁻¹ гентамицина (Россия). С целью проведения селекции гибридных клеток в ростовую среду добавляли НАТ (Sigma-Aldrich, США), содержащий гипоксантин (H), аминоптерин (A) и тимидин (T) в рабочем разведении.

Первичный скрининг гибридных культур проводили, начиная с 10-х суток после гибридизации. Специфическую активность антителопродукции гибридных культур определяли методом ТИФА («сэндвич»-вариант) трижды с интервалом 2–3 дня по мере интенсивности роста клеток. Для этого супернатанты гибридных клеток в объеме 100 мкл вносили в планшеты (NUNC, США), сенсibilизированные бруцеллезным антигеном в рабочем разведении в 50 мМ КББ. Комплекс «антиген-антитело» выявляли антивидовым пероксидазным конъюгатом (антитела кролика к иммуноглобулинам мыши) (Sigma-Aldrich, США). Реакцию учитывали определением оптической плотности при длине волны 492 нм (ОП₄₉₂) через 20 мин после внесения субстратно-индикаторной смеси. Пробы считали положительными, если ОП₄₉₂ в лунках с исследуемыми образцами в два и более раза превышала ОП₄₉₂ раствора в лунках с отрицательным контролем.

В настоящее время в литературе [8] имеются данные о наличии выраженного антигенного родства возбудителей бруцеллеза и кишечного иерсиниоза серогруппы O:9. Учитывая это обстоятельство, при повторном тестировании был проведен скрининг полученных гибридных культур с *Yersinia enterocolitica*. Для этого планшеты сенсibilизировали инактивированной микробной культурой *Y. enterocolitica* штамма 383 в рабочей концентрации в 50 мМ КББ. Далее постановку иммуноферментного анализа осуществляли, как описано выше.

Клонирование культур гибридных клеток проводили методом лимитирующих разведений при расчетной посевной концентрации одна клетка на лунку. Продуцирующую активность отдельных клонов определяли, начиная с 10-х суток, дважды с интервалом три дня методом иммуноферментного анализа по схеме, описанной выше. После выделения положительных клонов их клетки размножали в достаточном количестве, образцы замораживали в ростовой среде RPMI, содержащей 20 % фетальной телячьей сыворотки и 8 % диметилсульфоксида (Serva, Германия), и помещали на хранение в контейнер с жидким азотом.

Культуральные и секреторные свойства полученных клонов изучали в процессе культивирования *in vitro* в 24-луночных планшетах (Flow Laboratories, Великобритания) в течение десяти, а также *in vivo* в течение трех пассажей. Для изучения культуральных свойств гибридом готовили разведения культур от 2,0·10⁵ до 6,25·10³ клеток·см⁻³ и засеивали ими лунки планшета в объеме 1,0 см³. Культивирование осуществляли в течение 5 сут. За минимальную по-

севную концентрацию принимали концентрацию клеток, при которой в течение 5 сут наблюдали пролиферацию культуры, не требующей пассирования. При проведении пассирования учитывали частоту и коэффициент пересева.

Асцитные жидкости, содержащие моноклональные антитела, получали путем введения суспензии клонированных гибридных клеток в брюшную полость мышей линии BALB/c в дозе 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 см³ минерального масла пристана (Sigma-Aldrich, США). После образования асцитной опухоли (15–20-е сутки), асцитную жидкость извлекали. Клетки из полученного препарата осаждали центрифугированием при 2000 об./мин⁻¹ в течение 10 мин и закладывали на хранение, а надосадочную жидкость осветляли центрифугированием при 8000 об./мин⁻¹ в течение 30 мин и использовали в дальнейшей работе.

Имуноглобулины из асцитных жидкостей выделяли методом двукратного высаливания насыщенным раствором сульфата аммония с последующим диализом против 0,15 М натрия хлорида с добавлением 20 мМ фосфатного буферного раствора с pH 7,5.

Синтез конъюгатов иммуноглобулинов с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) осуществляли по методу Р.К.Nakane и А.Ж.Kawaoi [10].

С целью обоснованного выбора МКАТ, позволяющих методом ТИФА выявлять микробные культуры возбудителя бруцеллеза, был проведен анализ различных сочетаний антител в качестве сенситина и в составе конъюгата. Для этого планшет сенсibilизировали препаратами МКАТ, а также полученными в Филиале 48 ЦНИИ Минобороны России (Киров) бруцеллезными кроличьими иммуноглобулинами в рабочей концентрации 50 мМ КББ. После отмывки в лунки планшета вносили микробную культуру *B. melitensis* штамма 145 в концентрации 1,0·10⁷ м.к.·см⁻³. На следующем этапе, после отмывки, вносили приготовленные иммуноферментные конъюгаты в рабочем разведении. Реакцию учитывали определением ОП₄₉₂ через 20 мин после внесения субстратно-индикаторной смеси. Пробу считали положительной при величине ОП₄₉₂ равной 0,3 и более. При этом фоновые значения иммуноферментных конъюгатов не должны превышать величину ОП₄₉₂ равную 0,15.

Изучение диагностических возможностей препаратов моноклональных антител проводили методом ТИФА с использованием микробных культур *B. abortus* штамма 544 (биовар 1), *B. melitensis* штамма 145 (биовар 1), *B. suis* штамма 1330 (биовар 1) в диапазоне концентраций от 16,0·10⁶ до 1,25·10⁵ м.к.·см⁻³ с двукратным шагом, а также гетерологичных микробных культур: *Yersinia pestis* штамма EV, *Yersinia pseudotuberculosis* штаммов 147, 326 и 681, *Yersinia enterocolitica* штаммов 124, 134 и 383, *Burkholderia pseudomallei* штаммов C-141,

Duc-V и Dalat, *Burkholderia mallei* штаммов Ц-5, 10230 и 11, *Francisella tularensis* штаммов Schu, 503 и 543, *Escherichia coli* штамма 101, *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1 в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ м.к.·см⁻³. Постановку иммуноферментного анализа осуществляли как описано выше.

Результаты и обсуждение

Контроль эффективности иммунизации лабораторных животных смесью суспензий инактивированных микробных культур *B. abortus* штамма 544, *B. melitensis* штамма 145 и *B. suis* штамма 513 проводился путем оценки титра антител в сыворотках крови. Как выяснилось в процессе проведенного опыта, исследуемые сыворотки взаимодействовали с культурами возбудителя бруцеллеза в титрах от 1:16000 до 1:128000. Животных с титром антител 1:64000 и более использовали в дальнейшей работе в качестве источника иммунных спленоцитов.

В ходе исследований проведено два эксперимента по гибридизации клеток мышинной миеломы и лимфоцитов иммунизированных мышей гистосовместимой линии. В результате трехкратного скрининга гибридных культур на специфическую антителопродукцию было выявлено 57 положительных гибридных линий клеток. Из дальнейшей работы была исключена 51 клеточная культура (89,5%), дающая перекрестную реакцию с *Y. enterocolitica* серогруппы O:9. Оставшиеся 6 первичных культур нарастили, криоконсервировали и использовали для последующего клонирования. Результаты исследования культуральных и секреторных свойств данных гибридом представлены в табл. 1.

Полученные клоны гибридом в процессе культивирования устойчиво сохраняли пролиферирующую и антителопродуцирующую активность на протяжении десяти пассажей *in vitro* и трех пассажей *in vivo*. При этом, как видно из данных табл. 1, их минимальная посевная концентрация находилась на уровне $1,25 \cdot 10^4$ клеток·см⁻³ и $2,5 \cdot 10^4$ клеток·см⁻³, а частота пассирования составила один раз в 4–5 дней при коэффициенте пересева 1:4. Вместе с тем титр

Таблица 1

Культуральные и секреторные свойства гибридом

Наименование гибридной клеточной линии	Минимальная посевная концентрация, $\cdot 10^4$ клеток·см ⁻³	Оптимальная посевная концентрация, $\cdot 10^5$ клеток·см ⁻³	Титр МКАТ в культуральной жидкости	Титр МКАТ в асцитной жидкости
231G5D3	2,5	1,0	1:160	1:200000
231H6D8	2,5	1,0	1:160	1:400000
232B6H7	2,5	1,0	1:640	1:1600000
232G12F7	1,25	0,5	1:1280	1:1600000
233B2C5	1,25	0,5	1:640	1:1600000
233H6F3	2,5	1,0	1:320	1:400000

Примечание. Специфическая активность представлена в виде медиан титров антител, (n=5).

антител в культуральной жидкости находился в интервале от 1:160 до 1:1280, а в асцитной – от 1:200000 до 1:1600000.

Результаты анализа различных сочетаний антител (табл. 2) свидетельствуют о том, что МКАТ гибридных клеточных линий 232B6H7, 232G12F7, 233B2C5 как в качестве сенситина, так и в составе иммуноферментного конъюгата, а также в сочетании с бруцеллезными кроличьими иммуноглобулинами в качестве сенситина, дают наибольший сигнал в иммуноферментном анализе при выявлении микробной культуры возбудителя бруцеллеза.

Результаты исследований по оценке диагностических возможностей моноклональных антител для выявления микробных культур возбудителя бруцеллеза представлены в табл. 3.

Представленные в табл. 3 результаты свидетельствуют о том, что моноклональные антитела, продуцируемые гибридомами 232B6H7, 232G12F7, 233B2C5, в составе иммуноферментного конъюгата в сочетании с бруцеллезными кроличьими иммуноглобулинами в качестве сенситина позволяют методом иммуноферментного анализа выявлять микробные клетки различных видов и штаммов возбудителя бруцеллеза в концентрации от $0,25 \cdot 10^6$ до $1,0 \cdot 10^6$ м.к.·см⁻³. В то время как различные сочетания всех представленных МКАТ как в качестве сен-

Таблица 2

Результаты иммуноферментного анализа при выявлении микробной культуры возбудителя бруцеллеза с использованием различных сочетаний антител в качестве сенситина и в составе иммуноферментного конъюгата

Антитела, используемые в качестве сенситина		ОП ₄₉₂ в ТИФА при исследовании <i>B. melitensis</i> штамма 145 в концентрации $1,0 \cdot 10^7$ м.к.·см ⁻³ с использованием иммуноферментного конъюгата на основе МКАТ гибридной клеточной линии ... ($X_{cp} \pm I_{95}$), n=5					
		231G5D3	231H6D8	232B6H7	232G12F7	233B2C5	233H6F3
МКАТ гибридной клеточной линии ...	231G5D3	0,194±0,075	0,399±0,072	1,014±0,092	0,628±0,100	1,030±0,097	0,077±0,075
	231H6D8	0,375±0,075	0,068±0,075	1,735±0,139	1,494±0,103	1,351±0,111	0,066±0,075
	232B6H7	1,433±0,083	1,295±0,108	3,647±0,183	2,128±0,108	3,914±0,111	0,320±0,103
	232G12F7	0,905±0,097	1,373±0,117	3,746±0,095	2,516±0,095	3,860±0,128	0,088±0,079
	233B2C5	1,057±0,075	1,785±0,097	3,695±0,079	3,147±0,071	3,924±0,097	0,075±0,079
	233H6F3	0,120±0,072	0,087±0,079	0,269±0,083	0,075±0,075	0,253±0,081	0,199±0,081
Бруцеллезные кроличьи иммуноглобулины		0,849±0,114	1,217±0,133	3,944±0,131	3,559±0,122	4,003±0,120	0,170±0,131

Оценка диагностических возможностей специфических моноклональных антител к антигенам возбудителя бруцеллеза

Антитела, используемые в качестве сенситива		Выявляемая концентрация микробных культур ..., ·10 ⁶ м.к.·см ⁻³ с использованием иммуноферментного конъюгата на основе МКАТ гибридной клеточной линии ... (n=5)								
		<i>B. abortus</i> штамм 544			<i>B. meliensiensis</i> штамм 145			<i>B. suis</i> штамм 1330		
		232В6Н7	232G12F7	233В2С5	232В6Н7	232G12F7	233В2С5	232В6Н7	232G12F7	233В2С5
МКАТ гибридной клеточной линии ...	232В6Н7	4,0	8,0	2,0	4,0	8,0	2,0	4,0	16,0	4,0
	232G12F7	8,0	16,0	2,0	4,0	8,0	1,0	8,0	16,0	2,0
	233В2С5	4,0	4,0	2,0	4,0	4,0	2,0	8,0	8,0	2,0
Бруцеллезные кроличьи иммуноглобулины		0,5	1,0	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	1,0	0,25

Примечание. Результаты анализа являются полуколичественными.

ситина, так и в составе иммуноферментного конъюгата обеспечивают чувствительность ТИФА преимущественно на уровне от 2,0·10⁶ до 16,0·10⁶ м.к.·см⁻³. Все исследованные моноклональные антитела в иммуноферментном анализе не взаимодействуют с культурами гетерологичных микроорганизмов: *Y. pestis* штамма EV, *Y. pseudotuberculosis* штаммов 147, 326 и 681, *Y. enterocolitica* штаммов 124, 134 и 383, *B. pseudomallei* штаммов C-141, Duc-V и Dalat, *B. mallei* штаммов Ц-5, 10230 и 11, *F. tularensis* штаммов Schu, 503 и 543, *E. coli* штамма 101, *B. anthracis* штамма СТИ-1 в концентрации 1,0·10⁸ м.к.·см⁻³, что свидетельствует об их специфичности.

Таким образом, для выявления микробных культур возбудителя бруцеллеза наиболее перспективными являются моноклональные антитела, продуцируемые гибридными клеточными линиями 232В6Н7, 232G12F7, 233В2С5. Гибридомы-продуценты и препараты специфических бруцеллезных моноклональных антител планируется использовать для разработки и производства иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Желудков М.М., Цирельсон Л.Е., Горшенко В.В., Кулаков Ю.К. Эпидемические проявления современного бруцеллеза в Российской Федерации. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика*. 2009; 10:38–40.
2. Лямкин Г.И., Манин Е.А., Головнева С.И., Тихенко Н.И., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации в 2012 г. и прогноз на 2013 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1(115):21–4.
3. Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Хачатурова А.Н., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2014 г. и прогноз на 2015 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 2:22–4.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
5. Фельдшерова А.А., Эльгорт Д.А., Коноплева М.В., Хац Ю.С., Третьяков О.Ю., Кулаков Ю.К., Толмачева Т.А., Желудков М.М., Суслов А.П. Высокочувствительная иммуноферментная тест-система на основе моноклональных антител для выявления антигенов бруцелл. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2007; 1:52–7.

6. Цирельсон Л.Е., Желудков М.М. Бруцеллез в России: профессиональные заболевания и трудовой прогноз. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2011; 5:43–7.
7. Fazekas De St., Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980; 35:1–21.
8. Gerbier G., Garin-Bastuji B., Pouillot R. False-positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Vet. Res.* 1997; 28:375–83.
9. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517):495–97.
10. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–91.

References

1. Zheludkov M.M., Tsirel'son L.E., Gorshenko V.V., Kulakov Yu.K. [Epidemic manifestations of contemporary brucellosis in the Russian Federation]. *Epidemiol. i Vaksino profilakt.* 2009; 10:38–40.
2. Lyamkin G.I., Manin E.A., Golovneva S.I., Tikhenko N.I., Kulichenko A.N. [Epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2012 and the forecast for 2013]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1(115):21–4.
3. Lyamkin G.I., Khudoleev A.A., Khachaturova A.N., Kulichenko A.N. [Review of epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2014 and the forecast for 2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 2:22–4.
4. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. M.: CJSC "Shiko"; 2013. 560 p.
5. Fel'dsherova A.A., El'gort D.A., Konopleva M.V., Hats Yu.S., Tret'yakov O.Yu., Kulakov Yu.K., Tolmacheva T.A., Zheludkov M.M., Suslov A.P. [Highly sensitive immuno-enzyme test system based on monoclonal antibodies to detect brucella antigens]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Infek. Bol.* 2007; 1:52–7.
6. Tsirel'son L.E., Zheludkov M.M. [Brucellosis in Russia: occupational diseases and labor forecast]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2011; 5:43–7.
7. Fazekas De St., Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980; 35:1–21.
8. Gerbier G., Garin-Bastuji B., Pouillot R. False-positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Vet. Res.* 1997; 28:375–83.
9. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517):495–97.
10. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–91.

Authors:

Kuklina G.V., Elagin G.D., Fomenkov O.O., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A. Affiliated Branch of the Federal State Budgetary Institution «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Kirov, Russian Federation.

Об авторах:

Куклина Г.В., Елагин Г.Д., Фоменков О.О., Печенкин Д.В., Еремкин А.В., Кытманов А.А. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, Киров.

Поступила 29.07.16.