

Н.В.Богачева, Г.Д.Елагин, Д.В.Печенкин, А.А.Кытманов, О.В.Тихвинская, А.В.Ерёмкин

## РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ МОНОКЛОНАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* СЕРОГРУППЫ I

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

**Цель.** Разработать иммунохроматографическую моноклональную тест-систему для выявления возбудителя псевдотуберкулеза серогруппы I. **Материалы и методы.** В качестве специфических компонентов для разработки иммунохроматографической тест-системы были использованы мышинные моноклональные антитела гибридных клеточных линий, полученные на липолисахаридный антиген наружной мембраны «холодового» варианта псевдотуберкулезного микроба I серотипа (YP-101H2B4, YP-105C5A10); кроличьи антивидовые антитела против иммуноглобулинов мыши. Для получения конъюгата коллоидного золота с антителами (КЗ-АТ) были использованы частицы диаметром  $(30 \pm 2)$  нм. Для конъюгирования с коллоидным золотом использовали концентрацию антител, на 10–15 % превышающую точку выхода D580 на плато. Для изготовления иммунохроматографической тест-системы применяли комплект мембран фирмы MDI Easypack («Advanced Microdevice», Индия). Готовый конъюгат наносили на мембрану методом пропитывания. Антитела в аналитическую и контрольную мембраны в выбранной концентрации наносили с помощью диспенсора. Подложку с нанесенным конъюгатом и готовые рабочие мембраны сушили в вакуумном сухожаровом шкафу. Собранные иммунохроматографические тест-системы нарезали по 4,5 мм и тестировали на специфичность и чувствительность. **Результаты и выводы.** Разработана иммунохроматографическая тест-система, в которой использовали моноклональные антитела гибридной клеточной линии YP-105C5A10 в конъюгате с коллоидным золотом и моноклональные антитела гибридной клеточной линии YP-101H2B4 в тестовой линии. Тест-система обеспечивает выявление штаммов *Y. pseudotuberculosis* серогруппы I в концентрации от 500 тыс. м.к.·см<sup>-3</sup> (при тестировании 8 штаммов из 11 исследованных) до 4 млн м.к.·см<sup>-3</sup> и не выявляет при исследовании близкородственные иерсинии и гетерологичные микроорганизмы в концентрации 100 млн м.к.·см<sup>-3</sup>.

**Ключевые слова:** возбудитель псевдотуберкулеза серогруппы I, моноклональные антитела, иммунохроматографическая тест-система.

Корреспондирующий автор: Богачева Наталья Викторовна, e-mail: bogacheva70@mail.ru.

N.V.Bogacheva, G.D.Elagin, D.V.Pechenkin, A.A.Kytmanov, O.V.Tikhvinskaya, A.V.Eremkin

## Development of Immune-Chromatographic Monoclonal Test-System for the Detection of *Yersinia pseudotuberculosis*, Serogroup I

Affiliated Branch of the «48<sup>th</sup> Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

**Objective** of the study was to develop monoclonal immunoassay for the detection of the pseudotuberculosis agent, serogroup I. **Materials and methods.** Specific components, that were used for immune-chromatographic test-system development were mouse monoclonal antibodies of hybrid cell lines, obtained to lipopolysaccharide antigen of the outer membrane of the pathogen's «cold» variant (YP-101H2B4, YP-105S5A10); and rabbit anti-species antibodies against murine immunoglobulins. Particles,  $(30 \pm 2)$  nm in the diameter, were used to prepare colloidal gold-antibody conjugate. Antibody concentration for conjugation was 10–15 % greater than the D580 exit point on the plateau. For the production of immune-chromatographic test-system a set of membranes – MDI Easypack – manufactured by «Advanced Microdevice», India was deployed. Finished conjugate was applied onto the membrane by means of impregnation. Antibodies in the selected quantities were applied onto the analytical and control membranes via Dispensers. Substrates coated with the conjugate and ready-made working membranes were vacuum dried in a heat cabinet. Assembled immune-chromatographic test-systems were cut off 4.5 mm each and tested for specificity and sensitivity. **Results and conclusions.** Developed has been immune-chromatographic test-system for the detection of pseudotuberculosis pathogen, serogroup I. Utilized have been monoclonal antibodies of the hybrid cell line YP-105C5A10 in colloidal gold conjugate and monoclonal antibodies of the hybrid cell line YP-101H2B4 in the test line. The test-system allows for the detection of *Y. pseudotuberculosis* strains, serogroup I, at concentrations varying from 500 ths. m.c.·cm<sup>-3</sup> (8 of the 11 strains under study) up to 4 million m.c.·cm<sup>-3</sup> and does not identify closely related *yersinia* and heterologous microorganisms in quantities of 100 million m.c.·cm<sup>-3</sup>.

**Key words:** pseudotuberculosis agent, serogroup I; monoclonal antibodies, immune-chromatographic test-system.

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

Corresponding author: Natalia V. Bogacheva, e-mail: bogacheva70@mail.ru.

Citation: Bogacheva N.V., Elagin G.D., Pechenkin D.V., Kytmanov A.A., Tikhvinskaya O.V., Eremkin A.V. Development of Immune-Chromatographic Monoclonal Test-System for the Detection of *Yersinia pseudotuberculosis*, Serogroup I. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:65–68. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-65-68

Псевдотуберкулез (дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка) – острое инфекционное заболевание, характеризующееся полиморфизмом клинических проявлений с преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта, кожи и опорно-двигательного аппарата [5].

Заболевание представляет проблему для современной инфектологии, что обусловлено его широким территориальным распространением и сложностью диагностики [3, 4].

Широкому распространению заболевания способствуют выраженные адаптационные свойства возбудителя – *Yersinia pseudotuberculosis*. Возбудитель псевдотуберкулеза персистирует на всей территории РФ: в Приморском, Камчатском и Хабаровском краях, на Сахалине, в Сибири, областях Северо-Западного Федерального округа. Основным возбудителем заболевания является микроорганизм, относящийся к первой серогруппе. Заболеваемость в РФ псевдотуберкулезом за последние годы составила 7,1–7,3 случая на 100 тыс. населения. Различные по интенсивности вспышки и спорадические случаи за последние десятилетия зафиксированы в странах ближнего зарубежья и Скандинавии [1].

Сложность диагностики псевдотуберкулеза обусловлена многообразием его клинических форм и необходимостью проведения дифференциальной диагностики с большим количеством сходных по клиническим симптомам заболеваний как инфекционной, так и неинфекционной природы [3, 4, 5].

Постановка предварительного диагноза основана на совокупности характерных для псевдотуберкулеза признаков заболевания и данных эпиданамнеза, окончательного диагноза – на результатах лабораторной диагностики.

Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза построена на детекции возбудителя и его дифференциации от других представителей рода *Yersinia*. Для этого используют традиционные бактериологические, серологические и биохимические методы исследования [2]. Диагностическая эффективность бактериологического метода ограничена трудоемкостью и относительно длительными сроками исследования материала. Серологические методы (реакция агглютинации, непрямой гемагглютинации, иммуноферментный анализ), основанные на выявлении антител, имеют ряд таких серьезных недостатков, как невысокая специфичность и поздние сроки подтверждения диагноза [2, 4, 5].

В настоящее время разрабатываются новые экспрессные методы диагностики, направленные на сокращение времени проведения анализа, его упрощение при одновременном увеличении надежности и легкости интерпретации результатов при высокой чувствительности и специфичности. Этим требованиям отвечает метод иммунохроматографии, основанный на принципах тонкослойной хроматографии и реакции антигенов микробной клетки со специфическими антителами [9].

В связи с этим целью настоящей работы стала

разработка иммунохроматографической моноклональной тест-системы для выявления возбудителя псевдотуберкулеза серогруппы I.

## Материалы и методы

В работе использованы: золотохлористоводородная кислота («Sigma», США), цитрат натрия, Твин-20, бычий сывороточный альбумин (БСА) («MP Biomedicals», Великобритания), NaCl, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> («Химмед», Россия), полиэтиленгликоль-40000 («Sigma», США). Все вспомогательные компоненты были аналитической и химической чистоты. Растворы для получения коллоидного золота и его конъюгатов с антителами готовили на деионизированной воде, полученной с помощью установки Milli-Q (Millipore, США).

В качестве специфических компонентов иммунохроматографической тест-системы были использованы: мышинные моноклональные антитела (MkAt) гибридных клеточных линий, полученные на липолисахаридный (ЛПС) антиген наружной мембраны «холодового» варианта псевдотуберкулезного микроба I серотипа (YP-101H2B4, YP-105C5A10); кроличьи антивидовые антитела против иммуноглобулинов мыши. Все специфические компоненты получены специалистами филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров).

Для изготовления иммунохроматографической тест-системы применяли комплект мембран фирмы MDI Easypack («Advanced Microdevice», Индия): нитроцеллюлозную мембрану – CNPF-SN12-L2-P25 со скоростью ламинарного потока 4 см за 125 с для нанесения тестовой и контрольной зон; подложку для конъюгата – PT-R5; подложку для образца – GFB-R7L (0,6); подложку для адсорбента – APO45.

Коллоидное золото (КЗ) получали по методу Френса [7]. Результат электронной микроскопии показал высокую степень однородности частиц по размерным характеристикам [6]. Для получения конъюгата коллоидного золота с антителами (КЗ-АТ) были использованы частицы диаметром (30±2) нм.

Определение связывания антител с КЗ проводили по рекомендациям [8]. Оптимальную концентрацию MkAt для получения конъюгата КЗ-АТ определяли на основании полученных фотометрических данных, используя длину волны 580 нм (D580). Для конъюгирования, в соответствии с рекомендациями, выбрали концентрацию антител, на 10–15 % превышающую точку выхода D580 на плато.

При приготовлении конъюгата КЗ-АТ в коллоидное золото с pH 9,0 вносили раствор иммуноглобулинов с выбранной концентрацией. Смесь КЗ-АТ перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. По окончании времени инкубации в смесь добавляли 4 % ПЭГ-40000 в объеме, необходимом для получения конечной концентрации 0,25 %, и вновь перемешивали содержимое на вортексе. Смесь инкубировали в течение 15 мин.

Удаление несвязавшихся антител от частиц КЗ с

Иммунохимическая активность МкАт, полученных в ИФА, с антигенами *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*

МкАт гибридной клеточной линии	Минимальная выявляемая концентрация							
	липополисахарида, выделенного из мембраны бактерий <i>Y. pseudotuberculosis</i> штамма 164/84 серогруппы I, выращенных при температуре (°C), нг·см <sup>-3</sup>			бактерий <i>Y. pseudotuberculosis</i> штамма 164/84 серогруппы I, выращенных при температуре (°C), м.к.·см <sup>-3</sup>			липополисахарида, выделенного из мембраны бактерий <i>Y. pestis</i> штамма EB, выращенных при температуре 27–29 °C, нг·см <sup>-3</sup>	бактерий <i>Y. pestis</i> , штамма EB, выращенных при температуре 27–29 °C, м.к.·см <sup>-3</sup>
	4–8 °C	27–29 °C	36–38 °C	4–8 °C	27–29 °C	36–38 °C		
YP-105C5A10	1,0	1,0	7,8	1,0·10 <sup>4</sup>	2,5·10 <sup>4</sup>	1·10 <sup>5</sup>	>50000	>250·10 <sup>6</sup>
YP-101H2B4	3,9	2,0	500	2,5·10 <sup>4</sup>	5·10 <sup>4</sup>	5·10 <sup>5</sup>	То же	То же
YP-107C11A6	62,5	31,3	>500	1·10 <sup>5</sup>	2·10 <sup>5</sup>	1·10 <sup>6</sup>	То же	То же
YP-109H9D10	7,8	3,9	>500	0,5·10 <sup>5</sup>	1·10 <sup>5</sup>	1·10 <sup>6</sup>	То же	То же

иммобилизованными на их поверхности антителами проводили центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин. По окончании центрифугирования супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 0,025 М ТРИС-буфере с pH 8,0, содержащем 0,25 % БСА и 10 % сахарозу, в объеме, составляющем одну четвертую часть от первоначального, взятого для отмывки.

Готовый конъюгат наносили на мембрану методом пропитывания, создавая плотность распределения реагента из расчета 30 мкл на 1 см<sup>2</sup> подложки.

Для формирования аналитической и контрольной зон иммуноглобулины в выбранной концентрации наносили с помощью диспенсора со скоростью движения каретки 30 мм·с<sup>-1</sup> плотностью нанесения 0,1 мкл·мм<sup>-1</sup>. Подложки с нанесенным конъюгатом и готовые рабочие мембраны сушили в вакуумном сушильном шкафу при 40 °C в течение 2 ч. Собранные и нарезанные по 4,5 мм иммунохроматографические тест-системы упаковывали в пластиковые контейнеры, которые для хранения помещали в фольгированные пакеты с силикогелевым осушителем и запаивали при помощи микроконвеера.

**Результаты и обсуждение**

На первом этапе разработки иммунохроматографической тест-системы провели выбор МкАт путем определения иммунохимической активности антител в ИФА с антигенами *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*.

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о различной иммунохимической активности МкАт в отношении антигенов псевдотуберкулезного микроба. МкАт позволили выявить липополисахаридный антиген *Y. pseudotuberculosis* в концентрации от 1,0 до >500 нг·см<sup>-3</sup> в зависимости от температур-

ного варианта ЛПС, микробные клетки – от 10 тыс. до 1 млн м.к.·см<sup>-3</sup> в зависимости от температурного варианта выращивания микробной культуры.

Результаты оценки свидетельствуют об отсутствии перекрестного взаимодействия с ЛПС и микробной культурой чумного микроба, соответственно, в концентрациях 50 мкг·см<sup>-3</sup> и 250 млн м.к.·см<sup>-3</sup>, что подтверждает видоспецифичность полученных гибридом. Более широким взаимодействием и чувствительностью в отношении антигенов *Y. pseudotuberculosis* обладают МкАт, продуцируемые гибридными клеточными линиями YP-105C5A10 и YP-101H2B4.

Далее провели выбор различных комбинаций соответствующих МкАт при использовании их в качестве основы для приготовления конъюгатов с коллоидным золотом и для формирования тестовой зоны, обеспечивающих наиболее высокую эффективность иммунохроматографического анализа, направленного на выявление *Y. pseudotuberculosis*. Оценка чувствительности иммунохроматографического анализа при выявлении *Y. pseudotuberculosis* штамма 164/84 серогруппы I с использованием разных комбинаций специфических моноклональных антител представлена в табл. 2, из данных которой следует, что максимальную чувствительность (500 тыс м.к.·см<sup>-3</sup>) иммунохроматографического анализа при выявлении *Y. pseudotuberculosis* штамма 164/84 серогруппы I показал образец, в котором использовали МкАт гибридной клеточной линии YP-105C5A10 в конъюгате с коллоидным золотом и МкАт гибридной клеточной линии YP-101H2B4 в тестовой линии.

На рисунке представлена фотография анализа с

Таблица 2

Оценка чувствительности иммунохроматографического анализа при выявлении *Y. pseudotuberculosis* штамма 164/84 серогруппы I с использованием разных комбинаций специфических моноклональных антител

МкАт гибридной клеточной линии, используемые для формирования тестовой зоны	Чувствительность иммунохроматографического анализа при использовании конъюгата коллоидного золота с МкАт гибридной клеточной линии, м.к.·см <sup>-3</sup>	
YP-105C5A10	1,0·10 <sup>7</sup>	4·10 <sup>6</sup>
YP-101H2B4	5·10 <sup>5</sup>	1,0·10 <sup>7</sup>

Примечание: во всех случаях n=20.



Результаты изучения чувствительности анализа при использовании иммунохроматографической моноклональной тест-системы, предназначенной для выявления возбудителя псевдотуберкулеза серогруппы I

Таблица 3

Результаты оценки чувствительности и специфичности анализа с использованием иммунохроматографической моноклональной тест-системы для выявления *Y. pseudotuberculosis* серогруппы I

Вид (серогруппа) микроорганизма	Количество исследованных штаммов, шт.	Определяемая концентрация, м.к.·см <sup>-3</sup>	Количество выявляемых штаммов, шт.
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (I)	11	0,5·10 <sup>6</sup> –4·10 <sup>6</sup>	11
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (II)	1	1·10 <sup>8</sup>	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (III)	5	То же	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (IV)	1	«	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (V)	1	«	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (VI)	1	«	-
<i>Y. pestis</i>	3	«	-
<i>Y. enterocolitica</i>	3	«	-
<i>E. coli</i>	1	«	-

использованием иммунохроматографической моноклональной тест-системы непосредственно после его постановки. Данный образец иммунохроматографической тест-системы был использован для дальнейшей оценки чувствительности с другими штаммами *Y. pseudotuberculosis*, а также специфичности с культурами – *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*. Результаты оценки чувствительности и специфичности анализа с использованием иммунохроматографической моноклональной тест-системы для выявления *Y. pseudotuberculosis* серогруппы I представлены в табл. 3.

Оценка чувствительности и специфичности сконструированной иммунохроматографической моноклональной тест-системы показала, что она обеспечивает выявление штаммов *Y. pseudotuberculosis* серогруппы I в концентрации от 500 тыс. м.к.·см<sup>-3</sup> (8 штаммов из 11 исследованных) до 4 млн м.к.·см<sup>-3</sup> и не выявляет при исследовании штаммы других серогрупп псевдотуберкулезного микроба, близкородственные иерсинии, и гетерологичные микроорганизмы в концентрации 100 млн м.к.·см<sup>-3</sup>.

Время постановки анализа с использованием разработанной тест-системы составляло 15 мин.

В результате проведенных исследований разработана высокочувствительная и специфичная иммунохроматографическая моноклональная тест-система, перспективная для выявления возбудителя псевдотуберкулеза серогруппы I.

Малая продолжительность анализа, отсутствие промежуточных стадий, возможность как визуального, так и инструментального учета результатов позволяют рассматривать иммунохроматографический анализ как один из методов выявления *Y. pseudotuberculosis* при лабораторной диагностике псевдотуберкулеза.

Разработанная иммунохроматографическая тест-система может также использоваться в качестве дополнительного средства иммунохимического анализа, повышающего достоверность идентификации возбу-

дителя псевдотуберкулеза после этапа «холодового обогащения» проб.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Косилко С.А., Бренёва Н.В., Мазепа А.В., Окунев Л.П., Климов В.Т., Никитин А.Я., Сидорова Е.А., Севостьянова А.В., Трушина Ю.Н., Мельникова О.В., Ярыгина М.Б., Худченко С.Э., Чеснокова М.В., Андаев Е.И. Эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым инфекционным болезням бактериальной и вирусной этиологии в 2012 г. в Сибири и на Дальнем Востоке и прогноз ее развития на 2013 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1:38–43.
2. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство. 2-е изд. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
3. Покровский В.И., Сомов Г.П., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М.: Медицина; 2001. 256 с.
4. Ценева Г.Я., Воскресенская Е.А., Солодовникова Н.Ю. Биологические свойства иерсиний и лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и иерсиниоза: пособие для врачей. СПб.; 2001. С. 28–34.
5. Юшук Н.Д., Шестакова И.В. Псевдотуберкулез. Инфекционные болезни: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. С. 352–62.
6. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk. *Talanta*. 2010; 81(3):843–8.
7. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* 1973; 241:20–2. DOI: 10.1038/physci241020a0.
8. Hermanson G.T. Bioconjugat Techniques. 2nd Edition. Amsterdam: Acad. Press; 2008.
9. von Lode P. Point-of-care immunotesting: approaching the analytical performance of central laboratory methods. *Clin. Biochem.* 2005; 38(7):591–606. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2005.03.008.

#### References

1. Balakhonov S.V., Kosilko S.A., Breneva N.V., Mazepa A.V., Okunev L.P., Klimov V.T., Nikitin A.Ya., Sidorova E.A., Sevost'yanova A.V., Trushina Yu.N., Mel'nikova O.V., Yarygina M.B., Khudchenko S.E., Chesnokova M.V., Andaev E.I. [Epidemiological situation on natural focal infectious diseases of bacterial and viral etiology in 2012 in the territory of Siberia and Far East, and prognosis for 2013]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:38–43.
2. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases: Practice Guidelines]. 2nd edition. M.: "Shiko"; 2013. 560 p.
3. Pokrovsky V.I., Somov G.P., Besednova N.N., Antonenko F.F. [Pseudotuberculosis]. M.: "Meditsin"; 2001. 256 p.
4. Tseneva G.Ya., Voskresenskaya E.A., Solodovnikova N.Y. [Biological Properties of Yersinia and Laboratory Diagnostics of Pseudotuberculosis and Yersiniosis: Guide Book for Medical Officers]. St. Petersburg; 2001. P. 28–34.
5. Yushchuk N.D., Shestakova I.V. [Pseudotuberculosis. Infectious Diseases: National Guidelines]. M.: "GEOTAR-Media"; 2009. P. 352–62.
6. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk. *Talanta*. 2010; 81(3):843–8.
7. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* 1973; 241:20–2. DOI: 10.1038/physci241020a0.
8. Hermanson G.T. Bioconjugat Techniques. 2nd Edition. Amsterdam: Acad. Press; 2008.
9. von Lode P. Point-of-care immunotesting: approaching the analytical performance of central laboratory methods. *Clin. Biochem.* 2005; 38(7):591–606. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2005.03.008.

#### Authors:

Bogacheva N.V., Elagin G.D., Pechenkin D.V., Kytmanov A.A., Tikhvinskaya O.V., Eremin A.V. Affiliated Branch of the «48<sup>th</sup> Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 119, Oktyabrsky Avenue, Kirov, 610000, Russian Federation. E-mail: bogacheva70@mail.ru.

#### Об авторах:

Богачева Н.В., Елагин Г.Д., Печенкин Д.В., Кытманов А.А., Тихвинская О.В., Еремин А.В. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 610000, г. Киров, Октябрьский проспект, 119. E-mail: bogacheva70@mail.ru.

Поступила. 24.06.15.