

Н.П.Храпова¹, В.А.Антонов¹, Т.В.Булатова¹, Е.В.Пименова¹, И.И.Корсакова¹, Ю.А.Голосеев¹,
О.В.Пьянков², С.А.Пьянков², С.В.Серегин², И.В.Плясунов², П.Ф.Сафронов², В.С.Петров²,
А.П.Агафонов², А.Н.Сергеев², И.А.Дятлов³, И.Г.Шемякин³, Е.В.Белова³

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСА КРЫМ-КОНГО ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ

¹ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация; ²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Российская Федерация; ³ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» п. Оболensk, Российская Федерация

Целью работы явилось получение моноклональных антител к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), изучение их специфической активности в иммуноферментном анализе и при использовании метода флуоресцирующих антител. Мышей BALB/c иммунизировали инактивированным вирусом штамма 6757. При проведении скрининговых исследований в иммуноферментном анализе использовали рекомбинантный белок, состоящий из N-концевого фрагмента β-галактозидазы *E. coli* и полного N-белка вируса ККГЛ. Получена коллекция из 9 клонов гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам вируса Крым-Конго геморрагической лихорадки. На их основе сконструирована экспериментальная диагностическая биотин-стрептовидиновая иммуноферментная тест-система и получены лабораторные серии диагностических флуоресцирующих иммуноглобулинов с целью обнаружения антигенов возбудителя Крым-Конго геморрагической лихорадки. Доказана эффективность применения трех вариантов моноклональных антител (4G₄, 1E₂ и 3H₆) в качестве основы для изготовления средств обнаружения и идентификации вируса Крым-Конго геморрагической лихорадки в искусственно контаминированных образцах и клиническом материале, содержащих антигены ККГЛ.

Ключевые слова: вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки, моноклональные антитела, коллекция гибридом, депонирование.

N.P.Khrapova¹, V.A.Antonov¹, T.V.Bulatova¹, E.V.Pimenova¹, I.I.Korsakova¹, Yu.A.Gloseev¹, O.V.P'yankov²,
S.A.P'yankov², S.V.Seregin², I.V.Plyasunov², P.F.Safronov², V.S.Petrov², A.P.Agafonov², A.N.Sergeev²,
I.A.Dyatlov³, I.G.Shemyakin³, E.V.Belova³

Obtainment of Monoclonal Antibodies and Prospects of Their Application as Basis for Immunodiagnostic Aids for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Detection

¹Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation; ²State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation; ³State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Objective of the investigation was to obtain monoclonal antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHF) and to test their specific activity in enzyme-linked immunoassay as well as by deploying fluorescent antibodies technique. BALB/c mice were challenged with inactivated viral strain 6757. To perform screening investigations in enzyme-linked immunoassay applied was recombinant protein composed of N-terminal fragment of *E. coli* β-galactosidase and complete N-protein of CCHF virus. Collected were 9 clones of hybridomas – producers of monoclonal antibodies to CCHF virus antigens. Further on, on the basis of the hybridomas constructed was experimental diagnostic biotin-streptavidin immuno-enzyme test-system, obtained were laboratory series of diagnostic fluorescent immunoglobulins for the detection of CCHF agent antigens. Usage of three variants of monoclonal antibodies (4G₄, 1E₂, and 3H₆) as framework for the production of tools for CCHF virus detection and identification in artificially contaminated samples and clinical specimens containing CCHF antigens was proven efficient.

Key words: Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, monoclonal antibodies, hybridomas collection, depositing.

Вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) – возбудитель особо опасного трансмиссивного природно-очагового заболевания человека, входящего в перечень инфекционных (паразитарных) болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации [5, 10].

Границы ареала этой инфекции тесно связаны с регионами распространения клещей-переносчиков вируса ККГЛ. Возбудитель инфекции выявлен в 38 странах Азии, Африки и Европы [11]. В России стой-

кий природный очаг Крымской геморрагической лихорадки сформировался на территории Северо-Кавказского и Южного федеральных округов, где с 1999 по 2012 год зарегистрировано 1575 случаев заболевания [1, 3].

Регламентированными иммунодиагностическими методами обнаружения вируса ККГЛ являются сэндвич-вариант твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФМ) и метод флуоресцирующих антител (МФА) [6, 8, 9]

В настоящее время для практического исполь-

зования доступен только набор на основе поликлональных антител для иммуноферментного анализа (ИФА) «Вектор Крым-КГЛ-антиген» производства ЗАО «Вектор Бест». Ввиду отсутствия стандартных препаратов для контроля качества лабораторной диагностики Крымской геморрагической лихорадки относительная чувствительность и специфичность этого набора неизвестна.

В последние годы доля стандартизированных иммунодиагностических препаратов на основе моноклональных антител (МКА), отвечающих требованиям, предъявляемым к средствам экспресс-обнаружения и идентификации микроорганизмов, становится все более весомой. Отечественными и зарубежными учеными были получены и апробированы в лабораторных условиях экспериментальные образцы моноклональных препаратов [2, 13, 14, 15]. Однако данные о внедрении в практику таких препаратов отсутствуют.

Реализация современного подхода к созданию иммунодиагностических средств обнаружения вируса на основе МКА имеет ряд преимуществ, обусловленных возможностью работы с паспортизированными производственными штаммами гибридом-продуцентов целевого продукта с подтвержденными полезными свойствами, стабильно сохраняющими антителопродукцию в течение длительного периода времени при условии их хранения в криоконсервированном состоянии, что является существенным технологическим преимуществом по сравнению с работой с поликлональными антителами.

Целью настоящей работы явилось получение панели моноклональных антител (МКА) к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), изучение их специфической активности в ИФА и МФА.

Материалы и методы

Антигены. Иммунизацию мышей для получения МКА проводили инактивированным антигеном вируса ККГЛ штамм 6757. Вирус получали интрацеребральным заражением мышей-сосунков линии BALB/c. Концентрация белка по Бредфорду в препарате составляла 1 мг/мл.

В качестве антигена при проведении ИФА использовали рекомбинантный белок, состоящий из N-концевого фрагмента β -галактозидазы *E. coli* (около 40 кДа) и полного N-белка вируса ККГЛ, экспрессируемого в составе модифицированного вектора pUBEX. Для создания рекомбинантных белков использовали генетический материал вируса ККГЛ штамм С68031 [15] и изолированный от больного штамм STV/HU29223.

Получение рекомбинантных белков вируса ККГЛ осуществляли в клетках *E. coli* RRI, трансформированных плазмидой, кодирующей полный N-белок вируса ККГЛ, путем активации термоиндуцибельного промотора P(R) фага λ сдвигом температуры культивирования с 30 до 42 °С.

Животные и схема иммунизации. Инбредных мышей линии BALB/c получали из питомника экспериментальных биомоделей ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. Донорами иммунных спленоцитов в опытах по гибридизации клеточных линий являлись особи 8-недельного возраста, массой 16–18 г. В работе использовали схему дробного введения минимальных доз антигена в течение относительно короткого периода времени (5 недель). Суммарная нагрузка антигенного материала на каждую мышью линии BALB/c составляла 80 мкг белка антигена по Бредфорду.

Миеломная клеточная линия. Перевиваемая линия клеток мышшиной миеломы Sp 2/0 была получена из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Подготовку клеток миеломы начинали за 4 недели до опыта по гибридизации, соблюдая общепринятые требования [12].

Питательные среды и условия культивирования перевиваемых клеточных культур. Основной средой культивирования клеточных линий являлась среда RPMI-1640 производства ФГУП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова РАМН», дополненная необходимыми ингредиентами, соответствующими каждому конкретному этапу технологии. Культивирование перевиваемых клеточных линий выполняли в условиях CO₂-инкубатора при 37 °С, 5–7 % CO₂ и 70–80 % влажности. Для выращивания клеток использовали пластиковую посуду различного формата («Costar», США).

Метод скрининга МКА. Для скрининга МКА заданной специфичности в среде выращивания гибридом применяли непрямой вариант ТИФМ. В работе использовали коммерческий антивидовой конъюгат: антитела диагностические против IgG (H+L) мыши, меченные пероксидазой хрена, сухие (производства ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи»). Оптимальная доза антигена для сорбции составила 7 мкг/мл белка антигена в карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,5. Положительным контролем служили сыворотки мышей, иммунизированных антигеном вируса ККГЛ, отрицательным – сыворотки интактных животных. Все остальные условия выполнения ТИФМ соответствовали общепринятым требованиям [4].

Получение гибридом и выделение МКА. Гибридизацию клеточных линий производили через 3 сут после бустирующей инъекции антигена [12]. В качестве конъюгирующего агента использовали PEG-4000 («Merck», Германия). Для селекции гибридом клетки выращивали в НАТ-среде (две недели) и НТ-среде (одну неделю). Затем их переводили на полную питательную среду для культивирования клеточных линий. Гибридомы, продуцирующие специфические иммуноглобулины, клонировали методом предельных разведений. Тиражирование отобран-

ных клонов-продуцентов МКА проводили *in vitro* и *in vivo*. Моноклональные иммуноглобулины из среды культивирования и асцитической жидкости осаждали сульфатом аммония при 50 % его насыщения [12]. Специфическую активность целевого продукта оценивали по результатам ТИФМ. Полученные образцы МКА ампулировали небольшими квотами и хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до момента исследования.

Изготовление флуоресцирующих МКА. Для оценки перспектив использования МКА к антигенам вируса ККГЛ в прямом МФА были приготовлены экспериментальные образцы меченных флуоресцеинизотиоцианатом моноклональных иммуноглобулинов. Очистку конъюгата от немеченого белка и не связавшегося красителя проводили на колонке с сефадексом G-25. При расчете показателей концентрации белка и молярного соотношения $M_{\text{ФитЦ}}/M_{\text{белок}}$ использовали методику Т.Н.Тей и Т.Е.В.Фелткамп [12]. Готовые конъюгаты ампулировали и хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Результаты и обсуждение

В рабочую коллекцию из 9 продуцентов МКА к антигенам вируса ККГЛ вошли гибридомы с наиболее высокими показателями продукции специфических иммуноглобулинов. Продуктивность гибридом *in vitro* в среднем находилась в диапазоне концентраций от 0,51 до 0,64 мкг/мл, объем асцитической жидкости, как правило, соответствовал средним показателям асцитобразования (3–4 мл), при этом продуктивность *in vivo* составляла от 7 до 12 мг/мл иммуноглобулинов.

Для оценки целесообразности использования полученных МКА при создании диагностической иммуноферментной тест-системы была изучена специфическая активность МКА $4G_4/V_6$, $1E_2/E_5$ и $3H_6/F_2$. В качестве референс-панели использованы слабые разведения трех образцов, содержащих антигена ККГЛ (1-й и 2-й образцы – разные изоляты рекомбинантного белка, 3-й образец – природный неочищенный вирус ККГЛ) и один образец, содержащий антигена вируса ККГЛ (смесь лизатных белков перевиваемой линии клеток аденокарциномы надпочечников человека SV-13 и *E. coli*, вероятные примеси образцов № 1–3).

Диагностическая конструкция была построена по схеме прямого твердофазного трехстадийного иммуноферментного анализа (ИФА) разновидности «сэндвич». Ее основу составили два компонента: планшет-иммуносорбент с иммобилизованными на поверхности лунок МКА к белкам вируса ККГЛ и выявляющий образованные антителами с антигенами вируса ККГЛ комплексы конъюгат МКА-фермент. Для увеличения чувствительности на разных стадиях использовали два конъюгата: биотинилированные МКА и стрептавидин-полипероксидаза хрена – СПХ («STDGmbH», Германия). Визуализацию результатов анализа достигали добавлением к об-

разовавшимся иммунным комплексам раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина («MossInc», США) с последующей фиксацией окраски раствором серной кислоты. Регистрацию результатов в единицах оптической плотности (ОП) выполняли на планшетном фотометре.

Для активации иммуносорбента (96-луночный планшет из модифицированного полистирола, международная классификация «Maxisorp») наиболее эффективным оказалось использование карбонатного буферного раствора с последующей блокировкой свободных участков пластика на поверхности лунок планшета раствором казеина и сахарозы. При получении конъюгата МКА-биотин применена рутинная процедура биотинилирования [13]. Для подбора оптимальной концентрации МКА в иммуносорбенте и в биотинилированном конъюгате с целью выявления специфичного сигнала при низких концентрациях антигена вируса ККГЛ для каждого из трех вариантов МКА $3H_6/F_2$, $1E_2/E_5$, $4G_4/V_6$ были приготовлены по четыре 10-кратных разведения.

На первой стадии ИФА исходные образцы референс-панели разводили в 100 раз раствором Трис-ЭДТА с добавлением Тритона X-100 и инкубировали 1 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. После пятикратной отмывки фосфатно-солевым буферным раствором с добавлением Твин-20 в лунки планшета вносили биотинилированный конъюгат и инкубировали 1 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем после аналогичной отмывки в лунки планшета вносили раствор СПХ и инкубировали 1 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. На стадии визуализации иммунных комплексов в лунки планшета вносили раствор хромогена и инкубировали 15 мин при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Результаты учитывали при длине волны поглощения 450 нм. Для каждого значения ОП положительных образцов (№ 1–3) определяли коэффициент позитивности (Кпоз) как отношение ОП (положительного образца) к ОП (отрицательного контроля № 4) в каждой точке разведения МКА иммуносорбента и биотинилированного конъюгата. Эффективность выявления антигенов вируса ККГЛ оценивали по максимальному Кпоз.

Как видно из таблицы, максимально эффективное выявление для трех исследованных образцов антигенов возможно при использовании МКА $3H_6/F_2$ в качестве антител первого порядка, осуществляющих функцию захвата искомого антигена при условии внесения в каждую лунку планшета по 0,15 мкг этого образца и применения МКА $4G_4/V_6$ в качестве биотинилированного детектирующего антитела в конечной концентрации 1,5 мкг/мл. Перспективным следует считать также использование биотинилированного МКА $1E_2/E_5$ ввиду его потенциального сродства с эпитопами антигена № 1.

Полученные данные явились основанием для подготовки пакета нормативной документации на медицинское изделие – набор реагентов для иммуноферментного выявления антигенов вируса ККГЛ.

Сырьем для изготовления экспериментальных препаратов для МФА служили образцы четырех ва-

Оценка эффективности выявления антигенов ККГЛ в ИФА

МКА, сорбированные на пластике	Разведение, кг/мл	Результаты ИФА, выраженные в единицах коэффициента позитивности (Кпоз), равного отношению ОП положительных образцов (№ 1–3) к ОП отрицательного контроля (№ 4)								
		Конъюгаты детектирующих биотинилированных МКА *								
		1E2/E5			3H6/F2			4G4/B6		
		Номера антигенов								
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1E2/E5	150	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0
	15	1,3	1,1	0,8	1,0	1,0	0,9	1,0	0,8	1,0
	1,5	3,0	0,3	0,7	1,2	0,8	1,0	0,8	1,0	1,0
	0,15	4,1	1,9	0,2	0,9	0,8	0,7	0,4	0,7	0,7
3H6/F2	150	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	0,9	1,1	1,1	1,1
	15	1,2	0,9	0,9	1,0	1,1	0,9	0,9	1,0	0,9
	1,5	2,7	0,9	1,0	1,2	0,9	0,9	12,9	13,0	13,0
	0,15	1,5	1,0	0,9	0,9	0,9	0,8	0,5	0,9	1,2
4G4/B6	150	1,2	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0
	15	1,5	1,1	1,1	1,4	1,1	1,2	1,2	1,1	1,0
	1,5	3,8	0,6	1,1	1,1	0,7	0,8	0,9	1,1	1,0
	0,15	3,3	1,6	1,6	1,2	1,1	0,9	0,5	0,8	0,9

*Концентрация биотинилированных МКА 1,5 мкг/мл.

Примечания: антиген № 1 – рекомбинантный белок, содержащий аминокислотные последовательности, аналогичные белкам вируса ККГЛ изолят «1–2»; антиген № 2 – рекомбинантный белок, содержащий аминокислотные последовательности, аналогичные белкам вируса ККГЛ изолят «3»; антиген № 3 – природный неочищенный вирус ККГЛ.

риантов МКА (2G₁/B₃, 4G₄/D₁, 4F10/C₁₀ и 5E₄/G₆), накопленных *in vivo*. Параметры качества конъюгатов, приготовленных на их основе (концентрация белка – 4–6 мг/мл, показатель M_{ФИТЦ}/M_{белок} – 4–5), соответствовали требованиям, предъявляемым к препаратам, изготавливаемым на основе моноклональных иммуноглобулинов. Наибольшей специфической активностью при окрашивании контрольных мазков обладал образец иммуноглобулинов флуоресцирующих моноклональных 4G₄/D₁ с рабочим разведением 1:16.

Для проверки диагностических возможностей экспериментального препарата были изучены обеззараженные парные мазки-отпечатки кусочков органов шести умерших пациентов (легкое, печень, селезенка, почка, головной мозг), приготовленные из проб биологического материала, поступавшего на исследование методом ПЦР и подтверждение диагноза КГЛ. Отпечатки, расположенные на стекле слева, окрашивали смесью конъюгата 4G₄/D₁ и БСА, меченного родамином, справа – только БСА, меченного родамином. Положительные результаты были получены при просмотре мазков-отпечатков пяти пациентов, отрицательные – при просмотре биологического материала одного умершего пациента. Следует отметить, что полученный результат полностью совпал с результатами ПЦР. Эти данные свидетельствовали о том, что моноклональные иммуноглобулины 4G₄/D₁ пригодны для изготовления на их основе диагностического препарата для МФА, а также о возможности эффективного использования данного метода при работе с пробами биологического материала лихорадящих больных, умерших пациентов и лиц с неустановленным диагнозом, предположительно заболевших КГЛ.

Таким образом, получена коллекция гибридом-продуцентов специфических иммуноглобулинов, взаимодействующих с антигенами вируса ККГЛ, изучены диагностические возможности девяти вариантов МКА. Получены доказательства эффективности применения трех вариантов МКА (4G₄, 3H₆ и 1E₂) в качестве основы для изготовления иммунодиагностических средств обнаружения и идентификации вируса ККГЛ в исследуемом материале.

Штаммы гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus* ССНФVd-1 (4G₄/B₆), ССНФVd-2 (1E₂/E₃), ССНФVd-3 (3H₆/F₂) депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». В 2013 г. на них поданы три заявки на изобретения. Кроме того, подготовлен пакет нормативной документации на медицинское изделие «набор реагентов для иммуноферментного выявления антигенов вируса ККГЛ в жидкостях».

Работа выполнена по государственным контрактам № 42-Д/3 от 11.07.2012 г. и № 23-Д/5 от 04.09.2013 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)» в 2012–2013 гг.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волынкина А.С., Котенев Е.С., Малецкая О.В., Заикина И.Н., Шапошникова Л.И., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2012 г. и прогноз на 2013 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1:30–3.
2. Гайдамович С.Я., Мельникова Е.Э., Шуткова Т.М.,

Новохатский А.С., Турчинская А.Л. Характеристика моноклональных антител, индуцированных вирусом Крымской геморрагической лихорадки. *Вопр. вирусол.* 1989; 34(2):201–4.

3. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Бейер А.П., Санникова И.В., Пасечников В.Д., Ковальчук И.В., Ермаков А.В., Бутаев Т.М., Смирнова С.Е., Карань Л.С., Малеев В.В., Платонов А.Е. Крымская геморрагическая лихорадка в Евразии в XXI веке: эпидемиологические аспекты. *Эпидемиол. и инф. бол. Акт. вopr.* 2012; 3:42–53.

4. Кэтти Д., редактор. Антитела. Методы. Кн. 2. М.: Мир; 1991. 384 с.

5. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). 2-изд. ВОЗ. 2008. 90 с.

6. Онищенко Г.Г., редактор. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. Практическое руководство. М.: 2006. 288 с.

7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина, Шико; 2009. 472 с.

8. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики Крымской геморрагической лихорадки для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. МУК 4.2.3007-12. М.; 2012.

9. Санитарная охрана территории Российской Федерации. СП 3.4.2318-08. М.; 2008.

10. Смирнова С.Е. Мировой ареал вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки. *Бюл. сибирской медицины.* 2006; Приложение 1:79–87.

11. Blackburn N.K., Besselaar T.G., Shepherd A.J., Swanepoel R. Preparation and use of monoclonal antibodies for identifying Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987; 37(2):392–7.

12. Goding J.W. Monoclonal antibodies: principles and practice. 2nd ed. London: Acad. Press Inc.; 1986. P. 59–103.

13. Liu V., Green A. A. Monoclonal-antibody enzyme immunoassay for detection of hepatitis B surface antigen with use of a biotin-avidin system. *Clin. Chemistry.* 1985; 31(2):202–5.

14. Marriott A.C., Polyzoni T., Antoniadis A., Nuttall P.A. Detection of human antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus using expressed viral nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* 1994; 75:2157–61.

15. Saijo M., Tang Q., Shimay B., Han L., Zhang Y., Asiguma M., Tianshu D., Maeda A., Kurane I., Morikawa S. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of crimean-congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *J. Med. Virol.* 2005; 77(1):83–8.

References

1. Volynkina A.S., Kotenev E.S., Maletskaya O.V., Zaikina I.N., Shaposhnikova L.I., Kulichenko A.N. [Epidemiological situation on Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Russian Federation in 2012 and prognosis for 2013]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:30–3.

2. Gaidamovich S.Ya., Mel'nikova E.E., Shutkova T.M., Novokhatsky A.S., Turchinskaya A.L. [Characterization of monoclonal antibodies induced by Crimean hemorrhagic fever virus]. *Vopr. Virusol.* 1989; 34(2):201–4.

3. Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Vasilenko N.F., Beyer A.P., Sannikova I.V., Pasechnikov V.D., Koval'chuk I.V., Ermakov A.V., Butaev T.M., Smirnova S.E., Karan' L.S., Maleev V.V., Platonov A.E. [Crimean hemorrhagic fever in Eurasia in the XXI century: epidemiological aspects]. *Epidemiol. Infek. Bol. Actualn. Vopr.* 2012; 3:42–53.

4. Katty D., editor. [Antibodies. Methods]. Vol. 2. M.: Mir; 1991. 384 p.

5. [International Health Regulations (2005)]. 2-nd edition. WHO; 2008. 90 p.

6. Onishchenko G.G., editor. [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents. Practical Guidelines]. M.: 2006. 288 p.

7. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practical Guidelines]. M.: Meditsina. Shiko; 2009. 472 p.

8. [Order for organizing and conducting laboratory diagnostics of Crimean hemorrhagic fever in the laboratories of territorial, regional, and federal level. Methodological Regulations]. MR 4.2.3007-12. M.; 2012.

9. [Sanitary Protection of the Territory of the Russian Federation]. SR 3.4.2318-08. M.; 2008.

10. Smirnova S.E. [Global area of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus]. *Byul. Sibir. Meditsiny.* 2006; (Appendix 1):79–87.

11. Blackburn N.K., Besselaar T.G., Shepherd A.J., Swanepoel R. Preparation and use of monoclonal antibodies for identifying Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987; 37(2):392–7.

12. Goding J.W. Monoclonal antibodies: principles and practice. 2nd ed. London: Acad. Press Inc.; 1986. P. 59–103.

13. Liu V., Green A. A. Monoclonal-antibody enzyme immunoassay for detection of hepatitis B surface antigen with use of a biotin-avidin system. *Clin. Chemistry.* 1985; 31(2):202–5.

14. Marriott A.C., Polyzoni T., Antoniadis A., Nuttall P.A. Detection of human antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus using expressed viral nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* 1994; 75:2157–61.

15. Saijo M., Tang Q., Shimay B., Han L., Zhang Y., Asiguma M., Tianshu D., Maeda A., Kurane I., Morikawa S. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of crimean-congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *J. Med. Virol.* 2005; 77(1):83–8.

Authors:

Khrapova N.P., Antonov V.A., Bulatova T.V., Pimenova E.V., Korsakova I.I., Gloseev Yu.A. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

P'yankov O.V., P'yankov S.A., Seregin S.V., Plyasunov I.V., Safronov P.F., Petrov V.S., Agafonov A.P., Sergeev A.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Dyatlov I.A., Shemyakin I.G., Belova E.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Храпова Н.П., Антонов В.А., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Корсакова И.И., Голосеев Ю.А. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Пьянков О.В., Пьянков С.А., Серегин С.В., Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 04.09.14.