

Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С.

## МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ТЕРМОСТАБИЛЬНЫМ ПОВЕРХНОСТНЫМ АНТИГЕНАМ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1- И O139-СЕРОГРУППЫ

ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40

Получена панель из 9 гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МКА), направленные к поверхностным терморезистентным антигенным детерминантам холерных вибрионов Эль-Тор и O139. Установлено методом иммуноблоттинга, что большая часть из полученных МКА взаимодействует с соответствующими им эпитопами белковой природы на уровне 38–42 кДа. Выявлены различия в специфической направленности МКА к холерным вибрионам: 1-я группа МКА выявляет антигенные детерминанты, представленные только у штаммов *V. cholerae* O1, O139 с генетической характеристикой  $ctx^+ tcp^+$  и  $ctx^- tcp^+$ , и не выявляет штаммы  $ctx^- tcp^-$ ; 2-я группа МКА выявляет общие эпитопы для холерных вибрионов Эль-Тор и O139 независимо от наличия генов  $ctx$  и  $tcp$ . Новая панель МКА может быть применена для изучения тонкой антигенной структуры холерных вибрионов Эль-Тор и O139 и детекции в иммуноферментных методах эпидемически опасных штаммов с генотипом  $ctx^+ tcp^+$ .

Ключевые слова: холерный вибрион; гибридизация; моноклональные антитела; антигенная детерминанта; твердофазный иммуноферментный анализ; дот-иммуноанализ; иммуноблоттинг; белки наружных мембран.

Для цитирования: Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015; 20 (3): 51–57.

Evdokimova V. V., Alekseeva L. P., Kretenchuk O. F., Kruglikov V. D., Arkhangel'skaya I. V., Bursha O. S.

### MONOCLONAL ANTIBODIES TO THERMOSTABLE SURFACE ANTIGENS OF VIBRIO CHOLERAЕ O1 AND O139 SEROGROUPS

Rostov-on-Don Institute for Plague Control of Federal Agency for Consumer Rights Protection and Human Welfare Supervision, 117/40, Maksima Gorkogo Str., Rostov-on-Don, Russian Federation, 344002

There is delivered the panel of 9 hybridomas producing monoclonal antibodies directed to surface thermo-resistant antigenic determinants of *V. cholerae* El Tor and O139. By immunoblotting method most of MCA were established to react with the corresponding epitopes of protein nature at the level of 38–42 kDa. There were revealed differences in the specific orientation of the MCA to *Vibrio cholerae*: the first group of MCA identifies antigenic determinants presented only in strains of *V. cholerae* O1, O139 with genetic characteristic  $ctx^+ tcp^+$  and  $ctx^- tcp^+$ , but fails to identify strains  $ctx^- tcp^-$ ; the second group of MCA identifies common epitopes for *V. cholerae* El Tor and O139 regardless of  $ctx$  and  $tcp$  genes. The new panel of MCA can be used as well for the study of the fine antigenic structure of *V. cholerae* El Tor and O139 as detection of epidemically dangerous strains genotyped  $ctx^+ tcp^+$  with ELISA methods

Key words: *Vibrio cholerae*; hybridization; monoclonal antibodies; antigenic determinant; enzyme linked immunosorbent assay; dot-immunoassay; immunoblotting; outer membrane proteins.

Citation: *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni*. 2015; 20(3): 51–57. (In Russ.)

Достоверная иммунодиагностика возбудителей особо опасных инфекций может быть осуществлена только с применением высокоспецифичных антител. На сегодняшний день признано, что эффективной основой для производства высокоактивных иммунодиагностических препаратов являются моноклональные антитела (МКА). Гибридомная биотехнология позволяет получать высокоаффинные антитела уникальной специфичности к отдельным антигенным детерминантам (в отличие от поликлональных сывороток) диагностически значимых антигенов возбудителя холеры. Зарубежными учеными в конце прошлого столетия проводились работы по получению МКА к поверхностным антигенам *Vibrio cholerae* O1 и O139 (ЛПС, белки внешних мембран, пили адгезии), а также холерному токсину, с последующим конструированием на их основе высокоэффективных тест-систем: для слайд-агглютинации [1], набор CholeraeScreen для реакции коаггутинации [2], дот-блот-ИФА (иммуноферментный анализ) [3], флуоресцирующие им-

муноглобулины [4]. В последние годы исследователи сосредоточили внимание на создании тест-систем в формате иммуносенсоров (биомикрочипов), иммунохроматографических полосок (ИХ-стрипов, “дип-стикков”) и дот-ИФА-тестов, поскольку время их постановки находится в пределах от 5–15 мин до 1,2 ч, что особенно актуально при исследовании большого количества проб в эндемичных по холере районах. Так, Chen W. и соавт. [5] разработали для ускоренной диагностики холерных вибрионов серовара Огава иммунохроматографический тест, основанный на паре МКА, одно из которых специфически взаимодействует с эпитопами ЛПС штаммов Огава, т. е. тест-система позволяет дифференцировать серовары *V. cholerae* O1. J. Juoung и соавт. сконструировали иммуносенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса, используя МКА к *V. cholerae* O1 с чувствительностью  $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^9$  м.кл/мл [6]. Группа тайландских исследователей создала панель МКА для обнаружения и дифференциации *V. cholerae* O1, O139 и O141 методом дот-блоттинга [7]. Этими же авторами разработан для прямой детекции *V. cholerae* O139 в образцах морепродуктов высокочувствительный ( $104$  КОЕ  $мл^{-1}$ ) иммунохроматографический стрип-тест на основе

Для корреспонденции: Евдокимова Вероника Вячеславовна, nika-evd@yandex.ru

двух МКА [8]. При совместной работе тайландских и японских ученых сконструирован 5-минутный иммунохроматографический тест на основе МКА к липополисахариду *V. cholerae* O139 с чувствительностью 106 КОЕ/мл, который исключает перекрестные реакции с холерными вибрионами O1, не O1/не O139 [9].

В нашей стране также проводятся работы по получению МКА к холерным вибрионам и экспериментальные разработки иммунологических тест-систем: коаггутинационный и иммунофлуоресцентный диагностикум для выявления *V. cholerae* O1 [10], дот-иммуноанализ для экспресс-диагностики токсигенных штаммов *V. cholerae* [11], иммуноферментная тест-система для детекции возбудителя холеры O139 [12], ТИФА и дот-ИФА для контроля биосинтеза О-антигена *V. cholerae* O1 при производстве бивалентной химической вакцины [13], иммуноферментный анализ двойных антител (ИФА-2АТ) для оценки токсинопродукции штаммов холерных вибрионов O1 и O139 [14]. Зарегистрированными на сегодняшний день являются два набора диагностических препаратов на основе МКА (свидетельство о государственной регистрации № РЗН 2014/2142 от 16.12.14, № РЗН 2015/2336 от 26.01.15) для ускоренной диагностики *V. cholerae* O1 и O139 в реакциях иммунофлуоресценции и слайд-агглютинации. На современном этапе, учитывая актуальные направления в диагностике особо опасных инфекций, во ФГУН ГНЦ ПМБ (г. Оболensk) для обнаружения холерных вибрионов O1 разработаны иммунохроматографические тест-системы на основе МКА, полученных в Ростовском противочумном институте [15]. Также Е.В. Баранова и соавт. [16] сконструировали, используя МКА к холерному токсину, диагностикум «Тест-полоска *V. cholerae* tox». Следует отметить, что ИХ-тесты наряду с их преимуществами (получение результата в пределах 15 мин, простота постановки) не лишены недостатков: сравнительно низкая чувствительность порядка  $10^8$ – $10^9$  м.кл/мл зависит от качества используемых антител и концентрации антигена в биоматериале. В связи с этим актуальным является разработка препаратов на основе высокоспецифичных МКА, направленных к диагностически значимым антигенам холерных вибрионов, для постановки ИФА и дот-иммуноанализа, которые позволяют выявлять и дифференцировать *V. cholerae* O1 и O139 при концентрации их в пробе  $10^5$ – $10^6$  м.кл/мл. Нами разработаны и сконструированы экспериментальные серии пероксидазных конъюгатов на основе видоспецифических МКА, направленных к эпитопам О-полисахарида холерных вибрионов O1-серогруппы (ПХ-МКА O1) и соответственно серогруппы O139 (ПХ-МКА O139). Моноклональные конъюгаты в ТИФА и дот-ИФА имеют чувствительность порядка  $10^5$ – $10^6$  м.кл/мл, и строгую специфичность в отношении штаммов *V. cholerae* O1, O139 при отсутствии перекрестных реакций с представителями близкородственных и гетерологичных микроорганизмов [17]. Однако практический интерес представляют не только видоспецифические, но и серовароспецифические пероксидазные конъюгаты для дифференциации холерных вибрионов O1 Огава и Инаба в прямых вариантах дот-ИФА и ТИФА. Видо- и серовароспецифические детерминанты входят в состав термостабильного О-антигена, локализованного на поверхности холерных вибрионов O1. Поэтому цель данной работы – получение набора МКА к поверхностным антигенным детерминантам холерных вибрионов и оценка возможности их применения в научных ис-

следованиях и для разработки диагностических препаратов.

## Материалы и методы

**Штаммы микроорганизмов.** В работе были использованы 24 штамма *V. cholerae* O1: 8 – *V. cholerae* El Tor ctx<sup>+</sup> tcp<sup>+</sup>, 8 – *V. cholerae* El Tor ctx<sup>-</sup> tcp<sup>+</sup>, 8 – *V. cholerae* El Tor ctx<sup>+</sup> tcp<sup>-</sup>; 11 штаммов *V. cholerae* O139: 5 – *V. cholerae* O139 ctx<sup>+</sup> tcp<sup>+</sup>, 6 – *V. cholerae* O139 ctx<sup>-</sup> tcp<sup>-</sup>; 10 штаммов *V. cholerae* не O1/не O139; 3 – *E. coli*, 2 – *Salmonella spp.*, 4 – *Aeromonas*. Взвеси холерных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов готовили в 0,9% растворе хлорида натрия (рН 7,2±0,1) по стандартным образцам мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича 10 ед. (ОСО 42-28-85П), соответствующего года выпуска, эквивалентных концентрации  $1 \cdot 10^9$  м.кл/мл; клетки обеззараживали кипячением в течение 30 мин.

**Лабораторные животные.** Для получения перитонеальных макрофагов, иммунных спленоцитов использовали инбредных самок мышей линии Balb/c и беспородных белых мышей массой 16–20 г в возрасте 8–10 нед. Все эксперименты с животными были проведены в соответствии с Директивой Европейского союза 2010/63/EU. Умерщвление животных проводили с помощью ингаляционного наркотика хлороформом.

**Иммуноген.** Для иммунизации мышей Balb/c, служащих донорами иммунных спленоцитов, использовали цельные клетки токсигенного штамма *V. cholerae* El Tor 13020 (Инаба), обеззараженные кипячением в течение 30 мин. Иммунизацию проводили трехкратно с интервалом в 14 дней. Бустерную инъекцию вводили за 3 дня до сливания.

**Получение гибридом.** Получение гибридных клеток в соответствии с методикой Fazekas de St. и соавт. [18] проводили с помощью сливающего агента полиэтиленгликоля 1500 (Fluka, Sigma-aldrich, США). Использовали мышиную миеломную линию P3-X63/Ag8.653, полученную из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Тестирование антителопродуцирующих гибридом проводили в непрямом ТИФА [19] с использованием цельных микробных клеток штамма *V. cholerae* 13020, убитых кипячением. Мышинные иммуноглобулины выявляли пероксидазным конъюгатом BioRad (США). Результаты ТИФА учитывали с использованием спектрофотометра BioTek (США) по оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм (референс-волна 630 нм), считая позитивными лунки с образцами, интенсивность сигнала которых в 2 раза превышала ОП контрольных образцов. Из лунок, в которых регистрировали достоверно положительную реакцию, отбирали гибридомные клетки и клонировали их трижды методом предельных разведений [20] в НТ-среде (среда DMEM Gibco с 20% эмбриональной телячьей сыворотки NuClone). Для криоконсервирования гибридом применяли среду, содержащую 90% эмбриональной телячьей сыворотки NuClone (Thermo scientific, Англия) и 10% диметилсульфоксида (Panreac).

**Очистка специфических иммуноглобулинов.** Выделение иммуноглобулиновой фракции из культуральных жидкостей гибридом осуществляли преципитацией сульфатом аммония [21]. Очищенные препараты иммуноглобулинов консервировали добавлением мертиолатата натрия до конечной концентрации 0,01%. После проверки титра антител препараты разливали по аликвотам и хранили при температуре –20°C.

## Взаимодействие в ИФА моноклональных антител с холерными вибрионами *El Tor* и O139

Штамм <i>V. cholerae</i> (обеззараженный кипячением)	МКА (положительная реакция в ИФА)								
	H2F6	A5D8	E5F5	G3F5	B3A5	A5B6	D6	F11H2	4F5
<i>V. cholerae</i> El Tor ctx <sup>+</sup> tcp <sup>+</sup>	8/8*	8/8	8/7	8/7	8/8	8/8	8/8	8/7	8/8
<i>V. cholerae</i> El Tor ctx <sup>-</sup> tcp <sup>+</sup>	8/8	8/8	8/7	8/7	8/8	8/8	8/8	8/7	8/8
<i>V. cholerae</i> El Tor ctx <sup>-</sup> tcp <sup>-</sup>	8/0	8/8	8/0	8/0	8/8	8/0	8/8	8/0	8/8
<i>V. cholerae</i> O139 ctx <sup>+</sup> tcp <sup>+</sup>	5/5	5/5	5/4	5/4	5/5	5/5	5/5	5/4	5/5
<i>V. cholerae</i> O139 ctx <sup>-</sup> tcp <sup>-</sup>	6/0	6/6	6/1	6/1	6/6	6/0	6/6	6/1	6/6
<i>E. coli</i>	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0
<i>V. cholerae</i> не O1/не O139	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
<i>Aeromonas</i> spp.	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
<i>Salmonella</i> spp.	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0

Примечание. \* – отношение числа исследованных штаммов к числу штаммов, взаимодействующих с МКА.

**Электрофорез и иммуоблоттинг.** Электрофорез бактериальных взвесей проводили по U. Laemmli [22] в пластинах 12,5% полиакриламидного геля размером 70 × 100 × 0,7 мм в денатурирующих условиях при постоянном напряжении (концентрирование 50 В, разделение 120 В) на приборе Helicon. Использовали белковые маркеры молекулярной массы от 10 до 250 кДа (BioRad). Полусухой перенос фракций бактериальных лизатов из геля на нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) (BioRad, США) проводили при постоянной силе тока 200 мА (в течение 30 мин) на приборе Helicon. Для окраски белков на мембране использовали краситель Ponceau S (Reanal, Будапешт). Постановку иммуоблоттинга осуществляли, как описано Н. Towbin и соавт. [23].

## Результаты и обсуждение

Для иммунизации мышей в качестве иммуногена использовали микробные клетки, инактивированные кипячением, принимая во внимание, что специфический О-антиген устойчив к термообработке. После бустерного введения бактериальной взвеси *V. cholerae* El Tor 13020 титры специфических антител в гипериммунных сыворотках мышей в ИФА составили 1:80 000–1:160 000. После проведения гибридизации (парное слияние) было засеяно 760 лунок, в 190 из них обнаружены гибридные клеточные культуры, устойчивые в селективной среде НАТ. При первичном тестировании в ТИФА культуральных жидкостей (КЖ) гибридомой положительными оказались 180 клонов. Повторные скрининги КЖ показали, что большинство гибридных клеток утратили способность продуцировать МКА. В результате клонирования положительных гибридомой отобраны 9, которые показали при длительном культивировании стабильную антителопродукцию и хорошие ростовые свойства. Данные клоны были масштабированы путем последовательного пересева в культуральные флаконы возрастающего объема и заложены на хранение в жидкий азот в сосуды Дьюара.

В задачи исследования входило получение диагностически значи-

мых гибридом, поэтому в ТИФА первоначально оценили специфическую активность МКА и частоту представленности соответствующих им антигенных детерминант на поверхности холерных вибрионов O1-, O139-серогрупп. Испытуемые штаммы холерных вибрионов Эль-Тор и O139 из коллекции музея живых культур института, выделенные от человека и из объектов окружающей среды, отличались по наличию генов ctx, tcp. Как видно из результатов ТИФА (см. таблицу), определяющим для условного разделения МКА на группы явилось наличие в клетках гена tcp. По этому критерию в 1-ю группу входят МКА гибридом H2F6, F11H2, G3F5, E5F5, A5B6, вступающие в реакцию со штаммами *V. cholerae* El Tor, *V. cholerae*

O139, имеющих генотип ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup> и ctx<sup>-</sup>tcp<sup>+</sup>. Эти же МКА не взаимодействуют с клетками исследуемых штаммов, лишенных генов ctx, tcp. Другая группа включает МКА гибридом A5D8, B3A5, D6, 4F5, выявляющих общие эпитопы штаммов *V. cholerae* El Tor, O139, с которыми зарегистрирована положительная реакция, независимо от присутствия в клетках генов ctx, tcp. Отсутствие перекрестной реактивности с представителями близкородственных и гетерологичных микроорганизмов – свидетельство специфичности МКА в отношении холерных вибрионов O1-, O139-серогрупп.

Очевидно, что в плане диагностики первоочередной интерес представляют МКА 1-й группы. Подтверждение тому – результаты дот-ИФА на примере МКА гибридомы H2F6 (рис. 1), которые позволяют наглядно увидеть, что эти МКА только со штаммами *V. cholerae* El Tor и O139 tcp<sup>+</sup> образуют на НЦМ интенсивно окрашенные пятна. Положительная реакция не регистрируется с холерными вибрионами, не содержащими генов ctx, tcp.

Для определения химической природы антигенных детерминант, узнаваемых МКА и их эпитопной направленности мы использовали препарат ЛПС из штамма *V. cholerae* El Tor 5879 (выделен по О. Westphal и соавт. [24]) и общую белковую фракцию внешних мембран, выделенную из клеток штамма *V. cholerae* Classical 1395 (согласно методике Kabir S. [25]). При постановке ИФА, где на твердую фазу сенсibilizировали препарат ЛПС, у всех полученных МКА зарегистрирована отрицательная реакция. В качестве положительного

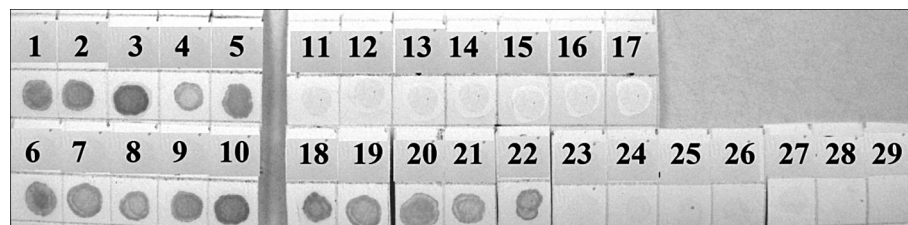


Рис. 1. Результаты определения специфичности МКА гибридомы H2F6 в дот-ИФА: 1–5 – штаммы *Vibrio cholerae* El Tor ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup> – 13020, 18826, 18895, 15261, 17834; 6–10 – штаммы *Vibrio cholerae* El Tor ctx<sup>-</sup>tcp<sup>+</sup> – 18780, 18775, 18781, 18786, 18778; 11–17 – штаммы *Vibrio cholerae* El Tor ctx<sup>-</sup>tcp<sup>-</sup> – 19435, 18898, 18512, 18776, 18729; 18–22 – *Vibrio cholerae* O139 ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup> – 16488, 16485, 16131, 16485, 16063; 23–26 – *Vibrio cholerae* O139 ctx<sup>-</sup>tcp<sup>-</sup> – 17682, 17780, 17780, 17780, 17785, 17788; 27 – *Vibrio cholerae* O22; 28 – *Salmonella* spp.; 29 – *E. coli*.

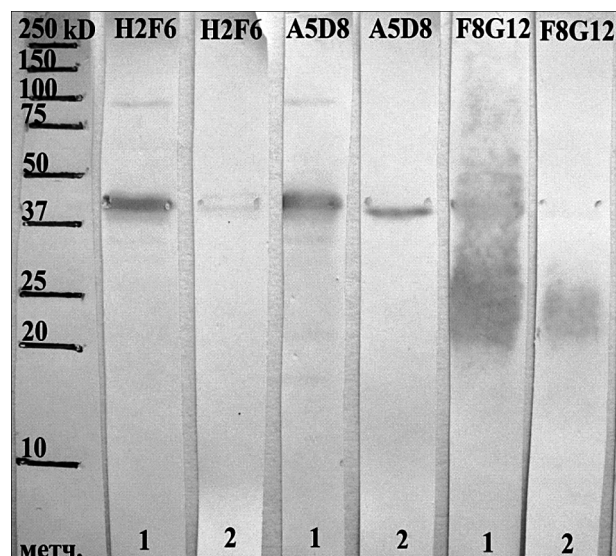


Рис. 2. Иммуноблот МКА с бактериальными лизатами:  
1 – *Vibrio cholerae* El Tor - 13020 (ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup>),  
2 – *Vibrio cholerae* El Tor 19435 (ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup>).

контроля использовали МКА гибридомы F8G12, направленные к эпитопам О-антигена холерных вибрионов О1-серогруппы [10]. Отсутствие специфической реакции исследуемых МКА с препаратом ЛПС также подтвердилось и при проведении иммуноблоттинга, так как не были выявлены специфические окрашенные зоны на нитроцеллюлозной мембране (рис. 2). Когда антигеном в ТИФА служили белки внешней мембраны, то окрашенные лунки были зарегистрированы только в отношении МКА D6 и 4F5, т. е. двух из девяти испытуемых. Из полученных данных следует, что терморезистентные антигенные детерминанты не принадлежат ЛПС. В то же время большая часть имеющихся МКА не вступала в реакцию с белковой фракцией наружных мембран, выделенных из штамма классического холерного вибриона.

Для получения дополнительных сведений по вопросу природы и локализации антигенных детерминант, выявляемых комплементарными им МКА, была осуществлена постановка иммуноблота с клеточными

лизатами штаммов *V. cholerae* El Tor 13020 (ctx<sup>+</sup> tcp<sup>+</sup>) и 19435 (ctx<sup>-</sup> tcp<sup>-</sup>), которые подвергли электрофорезу в ПААГ с Na-ДДС, затем осуществили перенос на НЦМ и проинкубировали с испытуемыми МКА (рис. 3).

Как видно, МКА гибридом H2F6, G3F5, E5F5, A5B6 взаимодействовали только с tcp<sup>+</sup>-штаммами, образуя интенсивную полосу, локализованную на уровне маркерных белков 38–42 кДа; у tcp<sup>-</sup>-штаммов аналогичная полоса не выявлена. Общие для tcp<sup>+</sup>- и tcp<sup>-</sup>-холерных штаммов эпитопы выявляли МКА гибридом A5D8 и B3A5 в районе маркерных белков 38–42 кДа, МКА гибридомы D6 узнает «свои» антигенные детерминанты в виде тонкой полосы на уровне примерно 60–65 кДа. В отличие от других МКА гибридомы 4F5 у tcp<sup>+</sup>-штамма выявляла 3 полосы, соответствующие 38–42, 14 и 10 кДа, тогда как у tcp<sup>-</sup>-штамма выявлялись только две нижние полосы – 10 и 14 кДа. Отечественные авторы при исследовании полипептидного профиля наружных мембран вирулентных и авирулентных штаммов *V. cholerae* O1- и O139-серогрупп установили, что полипептиды с мол. массой 35–46 кДа имеются у всех штаммов *V. cholerae* O1 и O139, обуславливая характерный вид электрофореграмм [26]. Из всего состава мажорных белков наружных мембран наибольшим уровнем экспрессии отличаются белки, мигрирующие в виде комплекса полипептидов с мол. массой 37–42 кДа. После проведения электрофореза и переноса белков из геля на НЦМ мембрана была окрашена красителем Ponceau S, в результате чего у всех трех штаммов визуализировалась интенсивная белковая полоса на уровне 38–42 кДа. В результате обработки НЦМ МКА на блотограмме обнаружены интенсивные полосы на уровне 38–42 кДа; и в связи с этим мы предположили, что полученные нами МКА специфически взаимодействуют с определенными белками наружных мембран. Из вышеприведенных данных следует (см. таблицу), что 1-я группа МКА, взаимодействующих в ТИФА с холерными вибрионами tcp<sup>+</sup>, не выявляет на блотограмме антиген 38–42 кДа у tcp<sup>-</sup>-штаммов, т. е. очевидны их различия по этим белкам. Установлено также, что белки наружных мембран у холерных вибрионов O139-серогруппы отличаются более высокой гетерогенностью в сравнении с холерными вибрионами O1, что видно на электрофореграмме после переноса на мембрану и окраски ее красителем Ponceau S. При постановке иммуноблоттинга клеточного лизата *V. cholerae* O139 16064 (ctx<sup>+</sup> tcp<sup>+</sup>) с МКА 1-й группы на блотограмме выявляется, помимо основной интенсивной полосы 38–42 кДа, несколько полос в диапазоне 20–37 кДа (рис. 4).

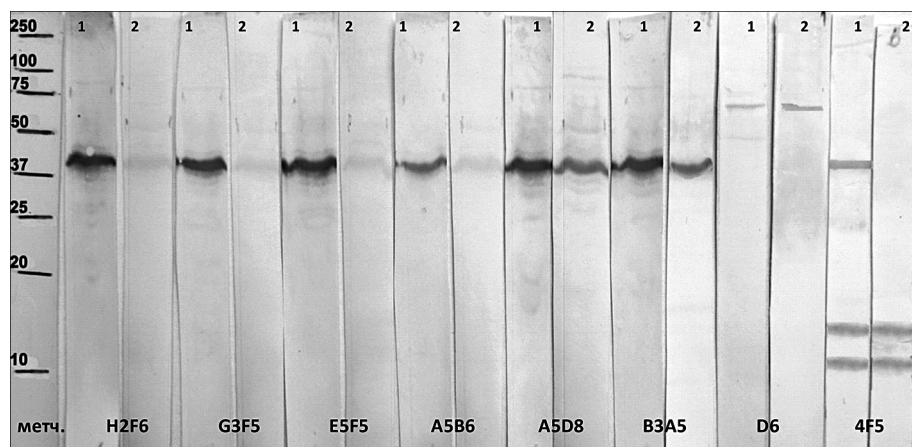


Рис. 3. Иммуноблот МКА с бактериальными лизатами:  
1 – *Vibrio cholerae* El Tor - 13020 (ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup>),  
2 – *Vibrio cholerae* El Tor - 19435 (ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup>).

### Закключение

Таким образом, в результате проведенных исследований получена панель гибридом-продуцентов МКА, направленных к поверхностным терморезистентным эпитопам холерных вибрионов Эль-Тор и O139.

К числу поверхностных структур относят и белки наружных мембран. Из имеющихся публикаций следует, что в результате электрофореза протеинов внешней мембраны представителей *V. cholerae* O1 регистрируется от 8 до 10 полос

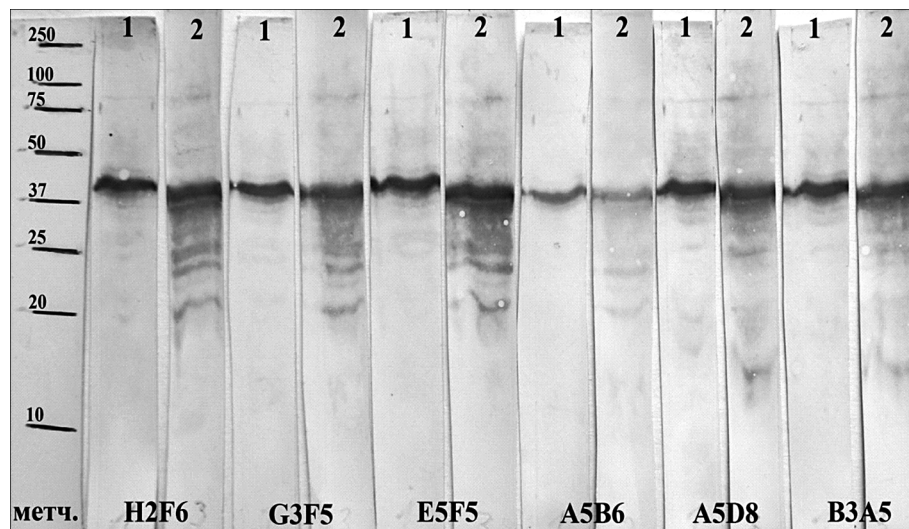


Рис. 4. Иммуноблот МКА с бактериальными лизатами:

1 – *Vibrio cholerae* El Tor - 13020 (ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup>),  
2 – *Vibrio cholerae* O139 16064 (ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup>).

в диапазоне 94–27 кДа с мажорной полосой 40–45 кДа [27]. Другие исследователи отмечают, что у холерных вибрионов O1, O139 наибольшим уровнем экспрессии отличаются белки наружных мембран, мигрирующие в виде комплекса полипептидов с мол. массой 37–42 кДа [26]. Нами в результате иммуноблоттинга обнаружено, что МКА, включенные в 1-ю группу, узнают соответствующие им антигенные детерминанты на уровне 38–42 кДа у штаммов *V. cholerae* El Tor и O139 с генотипом ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup> и ctx<sup>-</sup>tcp<sup>+</sup>. Аналогичные белки не обнаружены в составе поверхностных структур штаммов *V. cholerae* El Tor и O139 ctx<sup>-</sup>tcp<sup>-</sup>. Поскольку установлено разделение холерных штаммов по признаку наличия гена tcp, то вполне вероятной представлялась возможность выявления с помощью определенных МКА белка токсинорегулируемых пилей адгезии (ТКПА). Однако данные литературы [28] свидетельствуют, что мол. масса этого белка 20,5 кДа, тогда как различия между холерными штаммами tcp<sup>+</sup> и tcp<sup>-</sup> наблюдаются в отношении белков 38–42 кДа. Среди белков наружных мембран наибольший интерес представляют OmpT и OmpU соответственно с мол. массой 40 и 38 кДа [27, 29]. Вполне возможно, что в имеющемся у нас наборе есть МКА, направленные к эпитопам белков OmpT или OmpU. Последние являются протеинами, участвующими в образовании пор во внешней мембране, способствующими поступлению питательных веществ [27]. Они также обеспечивают устойчивость к антибиотикам, гидролитическим ферментам, солям желчных кислот и другим стрессовым воздействиям. Кроме того, установлено, что OmpU является важным протективным антигеном, обладает свойствами адгезинов, которые играют существенную важную роль в патогенезе холеры [30]. Данные в публикациях Б.Н. Мишанькина и соавт. (2013) свидетельствуют, что белок OmpT наделен протеолитической активностью, расщепляет протамин, фибрин, желатин, казеин, коллаген и активирует плазминоген человека в плазмин, что обеспечивает известные преимущества вибрионам во время пребывания в кишечнике чувствительного хозяина [31]. Дальнейшие исследования с помощью МКА позволят более точно определиться и выяснить, о каких поверхностных белках идет речь. В нашей работе клетки *V. cholerae* El Tor 13020, используемые в

качестве иммуногена, инактивировали кипячением и при этом белки наружных мембран сохранили свою активность, что позволяет отнести их к термостабильным антигенам. Большая часть из полученных МКА направлена к поверхностным терморезистентным белковым антигенам с мол. массой 38–42 кДа. МКА специфически взаимодействуют с клетками *V. cholerae* El Tor и O139, поэтому могут быть использованы для эпитопного анализа поверхностных антигенов холерных вибрионов O1 и O139, а также в иммуноферментных методах для детекции эпидемически опасных штаммов. Кроме того, создание панели МКА к антигенам холерных вибрионов позволит оценивать с помощью иммуноферментных методов эффективность экспрессии диагностически значимых генов и генов вирулентности по наличию или отсутствию

их продуктов. Это позволит проводить в совокупности с генетическими методами многофакторный анализ природных штаммов холерного вибриона. Изучение иммунобиологических свойств МКА позволит ответить на вопрос, какую функцию в клетке выполняют комплементарные им антигены. Последние можно выделить с помощью иммуносорбентов, приготовленных на основе специфических МКА.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Adams L.B., Henk M.C., Siebeling R.J. Detection of *Vibrio cholerae* with monoclonal antibodies specific for serovar O1 lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26 (9): 1801–9.
- Colwell R.R., Hasan J.A., Huq A., Loomis L., Siebeling R.J., Torres M. et al. Development and evaluation of a rapid, simple, sensitive, monoclonal antibody-based co-agglutination test for direct detection of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992; 76 (3): 215–9.
- Supawat K., Huttayananont S., Kusum M., Kalambaheti T., Chaicumpa W. A monoclonal antibody-based dot-blot ELISA diagnostic kit for the detection of *Vibrio cholerae* O1 in stools of diarrheic patients and household contacts. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 1994; 12 (2): 155–9.
- Hasan J.A., Bernstein D., Huq A., Loomis L., Tamplin M.L., Colwell R.R. Cholera DFA: an improved direct fluorescent monoclonal antibody staining kit for rapid detection and enumeration of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994; 120 (2): 143–8.
- Chen W., Lu J.Zh.G., Yuan Z., Wu Q., Li J., Xu G. et al. Development of an immunochromatographic lateral flow device for rapid diagnosis of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa. *Clin. Biochem.* 2014; 47 (6): 448–54.
- Jyoung J.Y., Hong S., Lee W., Choi J.W. Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance. *Siosens. and Bioelectron.* 2006; 21 (12): 2315–9.
- Pengsuk C., Longyant S., Rukpratanporn S., Chaivisuthangkura P., Sridulyakul P., Sithigorngul P. Differentiation among the *Vibrio cholerae* serotypes O1, O139, O141 and non-O1, non-O139, non-O141 using specific monoclonal antibodies with dot blotting. *J. Microbiol. Meth.* 2011; 87 (2): 224–33.
- Pengsuk Ch., Chaivisuthangkura P., Longyant S., Sithigorngul P. Development and evaluation of a highly sensitive immunochromatographic strip test using gold nanoparticle for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 in seafood samples. *Biosens. and Bioelectron.* 2013; 42: 229–35.
- Thattiyaphong A., Okada K., Khangrang S., Nispa W., Sawanpanyalert P., T. Honda T. Development of a 5-minute rapid test for detecting *Vibrio cholerae* O139. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth J.* 2013; 44 (3): 448–55.
- Бурлакова О.С. Моноклональные антитела к O-антигену возбудителя холеры: Дис. ... канд. мед. наук. Ростов-на-Дону; 1993.
- Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Терешкина Н.Е. Получение и применение моноклональных антител для обнаружения холерного токсина. В кн.: Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на ЧС в области обще-

- ственного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера. Саратов; 2012: 162–4.
12. Терешкина Н.Е. Изучение капсульных и бескапсульных форм *Vibrio cholerae* O139 с использованием поли- и моноклональных антител: Дисс. ... канд. мед. наук. Саратов; 2004.
  13. Сырова Н.А. Получение, характеристика и биотехнологические аспекты применения поли- и моноклональных антител к антигенам *Vibrio cholerae* O1 Инаба и Огава: Дисс. ... канд. биол. наук. Саратов; 2005.
  14. Маркина О.В. Изучение токсинопродуцирующей способности штаммов *Vibrio cholerae* O1 и *Vibrio cholerae* O139 с помощью иммуноферментного анализа и культуры клеток: Дисс. ... канд. биол. наук. Ставрополь; 2008.
  15. Алексеева Л.П., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Храмов М.В., Кругликов В.Д., Агафонова В.В. и др. Сравнительная оценка методов до-т-иммуноанализа и иммунохроматографии при выявлении холерных вибрионов O1 серогруппы. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010; 6: 88–93.
  16. Баранова Е.В., Федюкина Г.Н., Соловьев П.В., Колосова Н.В., Миронова Л.В., Куликалова Е.С. и др. Разработка иммунохроматографических тестов для выявления штаммов серогруппы O1 и токсинобразующих штаммов холерного вибриона. В кн.: Проблемная комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». Ростов-на-Дону; 2013; 26: 215–8.
  17. Алексеева Л.П., Козлова Г.А., Маркина О.В., Кретенчук О.Ф., Яговкин М.Э., Бурша О.С. Использование моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации холерных вибрионов O1, O139 в реакции до-т-иммуноанализа. Клиническая лабораторная диагностика. 2013; 3: 26–9.
  18. Fazekas de St., Groth S. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980; 35: 1–21.
  19. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа; 1991.
  20. Underwood P.A., Bean P.A. Hazards of the limiting-dilution method of cloning Hybridomas. *J. Immunol. Meth.* 1988; 107: 119–28.
  21. Кэтти Д., ред. Антитела: Методы. М.: Мир; 1991; кн. 1.
  22. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (5259): 680–5.
  23. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding. Current status and outlook. *J. Immunol. Meth.* 1984; 72: 313–40.
  24. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Meth. Carbohydr. Chem.* 1965; 5: 83–91.
  25. Kabir S. Composition and immunochemical properties of outer membrane proteins of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1980; 144: 382–9.
  26. Николаев В.Б., Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Марамонович А.С., Голубинский Е.П., Куликалова Е.С. и др. Полипептидный профиль наружных мембран вирулентных и авирулентных штаммов *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2007; 3 (55), прил.: 52–6.
  27. Kelley J.T., Parker Ch.D. Identification and preliminary characterization of *Vibrio cholerae* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* 1981; 145 (2): 1018–24.
  28. Herrington D.A., Hall R.H., Losonsky G., Mekalanos J.J., Taylor R.K., Levine M.M. Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J. Exp. Med.* 1988; 168 (4): 1482–92.
  29. Chakrabarti S.R., Chaudhuri K., Sen K., Das J. Porins of *Vibrio cholerae*: Purification and characterization of OmpU. *J. Bacteriol.* 1996; 178 (2): 524–30.
  30. Provenzano D., Klose K.E. Altered expression of the *ToxR*-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* resistance, virulence factors expression and intestinal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97 (18): 10 220–4.
  31. Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Шипко Е.С., Романова Л.В., Водопьянов А.С., Ерибекия А.К. и др. Система активации плазмиды у *Vibrio cholerae*. Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. 2013; 5: 13–20.
  4. Hasan J.A., Bernstein D., Huq A., Loomis L., Tamplin M.L., Colwell R.R. Cholera DFA: an improved direct fluorescent monoclonal antibody staining kit for rapid detection and enumeration of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994; 120 (2): 143–8.
  5. Chen W., Lu J.Zh.G., Yuan Z., Wu Q., Li J., Xu G. et al. Development of an immunochromatographic lateral flow device for rapid diagnosis of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa. *Clin. Biochem.* 2014; 47 (6): 448–54.
  6. Jyoung J.Y., Hong S., Lee W., Choi J.W. Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance. *Siosens. and Bioelectron.* 2006; 21 (12): 2315–9.
  7. Pengsuk C., Longyant S., Rukpratanporn S., Chaivisuthangkura P., Sridulyakul P., Sithigorngul P. Differentiation among the *Vibrio cholerae* serotypes O1, O139, O141 and non-O1, non-O139, non-O141 using specific monoclonal antibodies with dot blotting. *J. Microbiol. Meth.* 2011; 87 (2): 224–33.
  8. Pengsuk Ch., Chaivisuthangkura P., Longyant S., Sithigorngul P. Development and evaluation of a highly sensitive immunochromatographic strip test using gold nanoparticle for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 in seafood samples. *Biosens. and Bioelectron.* 2013; 42: 229–35.
  9. Thattiyaphong A., Okada K., Khangrang S., Nispa W., Sawanpanyalert P., T. Honda T. Development of a 5-minute rapid test for detecting *Vibrio cholerae* O139. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth J.* 2013; 44 (3): 448–55.
  10. Burlakova O.S. *Monoclonal Antibodies to the O-antigen of the Cholera Causative Agent*: Diss. Rostov-na-Donu; 1993. (in Russian)
  11. Mikheeva E.A., Devdariani Z.L., Tereshkina N.E. Production and use of monoclonal antibodies for cholera toxin detection. In: *Present Day Technologies in the Advancement of Preventive and Response Measures in Case of Emergency Situations of Sanitary-epidemiological Nature in the Sphere of Public Health. Proceedings of the XI International Scientific Practical Conference.* Saratov; 2012: 162–4. (in Russian)
  12. Tereshkina N.E. *Study of Capsular and Non-capsular Vibrio Cholerae O139 Forms with the Use of Poly- and Monoclonal Antibodies*: Diss. Saratov; 2004. (in Russian)
  13. Syrova N.A. *Production, Characterization and Biotechnological Aspects of Usage of Poly- and Monoclonal Antibodies to Antigens of Vibrio Cholerae O1 Inaba and Ogawa*: Diss. Saratov; 2005. (in Russian)
  14. Markina O.V. *Study of the Toxin-producing Ability of Vibrio Cholerae O1 and Vibrio Cholerae O139 Strains with the Use of Immunoenzyme Assay and cell Culture*: Diss. Stavropol'; 2008. (in Russian)
  15. Alekseeva L.P., Telesmanich N.R., Lomov Yu.M., Khramov M.V., Kругликов V.D., Agafonova V.V. et al. Comparative evaluation of dot-immunoassay and immunochromatographic methods in detection of *Vibrio cholerae* O1 serogroup. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2010; 6: 88–93.
  16. Baranova E.V., Feduykina G.N., Solov'ev P.V., Kolosova N.V., Mironova L.V., Kulikalova E.S. et al. The development of immunochromatographic tests for the detection of O1 and toxin-forming *Vibrio cholerae* strains. In: *Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans: The Commission on Scientific Problem. [Problemnaya komissiya "Kholera i patogennyye dlya cheloveka embriony]*. Rostov-na-Donu; 2013; 26: 215–8. (in Russian)
  17. Alekseeva L.P., Kozlova G.A., Markina O.V., Kретенчук O.F., Яговкин M.E., Бурша O.S. The use monoclonal peroxidase conjugate for identification of *Vibrio cholerae* O1, O139 in the reaction of the dot-immunoassay. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2013; 3: 26–9. (in Russian)
  18. Fazekas de St., Groth S. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980; 35: 1–21.
  19. Egorov A.M., Osipov A.P., Dzantiev B.B., Gavrilova E.M. *Theory and Practices of Immunoenzyme Analysis. Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza*. Moscow: Vysshaya shkola; 1991. (in Russian)
  20. Underwood P.A., Bean P.A. Hazards of the limiting-dilution method of cloning Hybridomas. *J. Immunol. Meth.* 1988; 107: 119–28.
  21. Ketti D., ed. *Antibodies: Methods. [Antitela: Metody]*. Moscow: Mir; 1991; book 1. (in Russian)
  22. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (5259): 680–5.
  23. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding. Current status and outlook. *J. Immunol. Meth.* 1984; 72: 313–40.
  24. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Meth. Carbohydr. Chem.* 1965; 5: 83–91.
  25. Kabir S. Composition and immunochemical properties of outer membrane proteins of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1980; 144: 382–9.
  26. Nikolaev V.B., Markov E.Yu., Urbanovich L.Ya., Maramovich A.S., Golubinskiy E.P., Kulikalova E.S. et al. Polypeptide profile of outer membranes of virulent and avirulent *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains. *Byulleten' VSNTs SO RAMN.* 2007; 3 (55), pril. 52–6. (in Russian)
  27. Kelley J.T., Parker Ch.D. Identification and preliminary characterization of *Vibrio cholerae* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* 1981; 145 (2): 1018–24.

Поступила 20.05.15

## REFERENCES

1. Adams L.B., Henk M.C., Siebeling R.J. Detection of *Vibrio cholerae* with monoclonal antibodies specific for serovar O1 lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26 (9): 1801–9.
2. Colwell R.R., Hasan J.A., Huq A., Loomis L., Siebeling R.J., Torres M. et al. Development and evaluation of a rapid, simple, sensitive, monoclonal antibody-based co-agglutination test for direct detection of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992; 76 (3): 215–9.
3. Supawat K., Huttayanant S., Kusum M., Kalambaheti T., Chaicumpa W. A monoclonal antibody-based dot-blot ELISA diagnostic kit for the detection of *Vibrio cholerae* O1 in stools of diarrheic patients and house-

28. Herrington D.A., Hall R.H., Losonsky G., Mekalanos J.J., Taylor R.K., Levine M.M. Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J. Exp. Med.* 1988; 168 (4): 1482–92.
29. Chakrabarti S.R., Chaudhuri K., Sen K., Das J. Porins of *Vibrio cholerae*: Purification and characterization of OmpU. *J. Bacteriol.* 1996; 178 (2): 524–30.
30. Provenzano D., Klose K.E. Altered expression of the *ToxR*-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* resistance, virulence factors expression and intestinal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97 (18): 10 220–4.
31. Mishan'kin B.N., Duvanova O.V., Shipko E.S., Romanova L.V., Vodop'yanov A.S., Eribekyan A.K. et al. The system of plasminogen activation in *Vibrio cholerae*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2013; 5: 13–20. (in Russian)

Received 20.05.15

## Сведения об авторах:

**Евдокимова Вероника Вячеславовна**, науч. сотр. гр. гибридом лаб. микробиологии холеры, nika-evd@yandex.ru; **Алексеева Людмила Павловна**, д.б.н., проф., рук. гр. гибридом лаб. микробиологии холеры; **Кретенчук Оксана Федоровна**, к.б.с., н.с. гр. гибридом лаб. микробиологии холеры; **Бурша Ольга Сергеевна**, науч. сотр. гр. гибридом лаб. микробиологии, к.м.н., зав. лаб. микробиологии холеры; **Кругликов Владимир Сергеевич**, к.м.н., зав. лаб. микробиологии холеры; **Архангельская Ирина Викторовна**, н.с. лаб. микробиологии холеры.

## ОБМЕН ОПЫТОМ

© НИКОЛАЕВА Л.И., БЕХЗАДПУР Д.Н., 2015

УДК 616:36-002-022-036.22(55)

*Николаева Л.И.<sup>1</sup>, Бехзадпур Д.Н.<sup>2</sup>*

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ С ГЕПАТИТОМ С В ИРАНЕ

<sup>1</sup>ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 16; <sup>2</sup>Исламский Университет Азада, отделение Решт, Иран, 41335-3516, г. Решт, ул. Поле телешан, 17

*Цель – представить современные данные по эпидемиологии гепатита С в Исламской Республике Иран. В обзоре рассмотрены основные пути передачи инфекции, группы риска и структура генотипов вируса гепатита С.*

*Ключевые слова: гепатит С; эпидемиология; Иран.*

*Для цитирования: Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015; 20 (3): 57–60.*

*Nikolaeva L.I., Behzadpour D.N.*

EPIDEMIOLOGICAL SITUATION WITH HEPATITIS C IN IRAN

<sup>1</sup>N.F. Gamaleya Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, 16, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation, 123098

<sup>2</sup>Islamic Azad University, Rasht branch, 17, Pole teleshan Str., Rasht, Iran, 41335-3516

*The aim of the review was to present modern data on epidemiology of hepatitis C in Islamic Republic of Iran. In the review there are considered main routs of the infection transmission, groups of high risk and structure of hepatitis C genotypes.*

*Key words: hepatitis C; epidemiology; Iran.*

*Citation: Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. 2015; 20(3): 57–60. (In Russ.)*

## Введение

Вирусный гепатит С – повсеместно распространенное инфекционное заболевание, передающееся через кровь и препараты крови, а также половым и вертикальным путями. Хронический гепатит С является наиболее частой причиной тяжелых заболеваний печени: цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы.

Показатель распространенности гепатита С по странам сильно варьирует: от 0,2 до 40% [1–4]. В развитых странах он достигает 0,2–2,2%, а в развивающихся –

почти 7% [3]. Высокая частота выявления инфицированных лиц (более 3,5%) характерна для большинства стран Северной Африки, Среднего Востока, Центральной и Восточной Азии, наименьшая (менее 1,5%) – для государств Северной Америки, островов азиатской части Тихого океана и тропической части Латинской Америки [4]. В остальных государствах доля инфицированных лиц составляет от 1,5 до 3,5% всего населения страны.

В начале и середине прошлого века распространение гепатита С происходило более интенсивно из-за двух глобальных войн, процедур переливания крови на фоне отсутствия диагностических тест-систем для выявления маркеров этой инфекции и инъекционной наркомании. Первые диагностикумы для обнаружения маркеров гепатита С появились в начале 1990-х годов. Процесс распространения этой инфекции особенно интенсифи-

*Для корреспонденции: Николаева Людмила Ивановна*, руководитель лаб. генно-инженерных препаратов, доктор биол. наук, e-mail: L.i.nikolaeva@mail.ru. 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16. Институт вирусологии им. Д.И. Иванова при ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», e-mail: L.i.nikolaeva@mail.ru.