

РАЗРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МИКРОЧИПА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

Д.В. Уткин, М.Н. Киреев, Н.П. Гусева, Г.А. Каплун, В.Е. Куклев, Н.А. Осина

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия

Резюме. Современные отечественные препараты, предназначенные для серологической диагностики чумы, направлены, как правило, на выявление в сыворотке крови антител к одному антигену. Для повышения достоверности результатов анализа целесообразно применение тест-систем для одновременного определения уровня антител к нескольким иммунодоминантным антигенам *Yersinia pestis*. Изучена возможность применения биочиповых технологий для оценки специфических антител к антигенам возбудителя чумы. Объект исследования — 5 коммерческих сывороток, 35 сывороток крови людей, вакцинированных живой чумной вакциной со сроками забора материала через 1, 4, 5, 18 месяцев после вакцинации, 5 сывороток здоровых доноров. Цель данной работы — разработка биологического микрочипа (иммуночипа) для выявления антител к антигенам возбудителя чумы. Для этого аминомодифицированные слайды сенсibilизировали препаратами иммунодоминантных антигенов *Y. pestis*: капсульного антигена F1, липополисахарида (ЛПС), основного соматического антигена (ОСА), фибринолизина, пестина ПП. Оценка диагностической специфичности и чувствительности иммуночипа осуществляли с использованием зарегистрированных гомо- и гетерологичных иммунобиологических препаратов и экспериментальных сывороток животных. Диагностическая эффективность иммуночипа составила 100%. Проведена оценка возможности применения иммуночипа для определения профиля специфических антител у людей, вакцинированных живой чумной вакциной. В качестве препарата сравнения использовали коммерческую иммуноферментную тест-систему «ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*». Применение иммуноферментной тест-системы позволило выявить наличие антител к антигену F1 *Y. pestis* у 77,1% вакцинированных людей в сроки забора материала от 1 до 18 месяцев после вакцинации в титре 1:160–1:2560. Оценка профиля антител с помощью иммуночипа показала присутствие антител к антигену F1 у 91,4% вакцинированных в титре 1:320–1:2560. Кроме того, использование иммуночипа позволило обнаружить антитела к ЛПС, ОСА, пестину ПП у 54,3; 20; 42% вакцинированных людей соответственно. Процент положительной сероконверсии у лиц, вакцинированных живой чумной вакциной, составил 77,1% по результатам ИФА, 91,4% к антигену F1 — по результатам анализа с применением иммуночипа, 94,3% — по результатам анализа с расширенной панелью антигенов. Применение нескольких антигенных маркеров в составе иммуночипа позволило выявить больший процент сероконверсии среди вакцинированных людей, чем традиционный иммуноферментный анализ. Полученные результаты указывают на перспективу применения иммуночипа для оценки гуморального иммунитета.

Ключевые слова: биочип, антитела, антигены, чума, иммунитет.

Адрес для переписки:

Уткин Денис Валерьевич
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.
Тел./факс: 8 (8452) 51-52-11 (служебн.).
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Contacts:

Denis V. Utkin
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46,
Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe".
Phone/Fax: +7 (8452) 51-52-11 (office).
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Библиографическое описание:

Уткин Д.В., Киреев М.Н., Гусева Н.П., Каплун Г.А., Куклев В.Е., Осина Н.А.
Разработка биологического микрочипа для выявления антител
к антигенам возбудителя чумы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2.
С. 393–398. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-393-398

Citation:

Utkin D.V., Kireev M.N., Guseva N.P., Kaplun G.A., Kuklev V.E., Osina N.A.
A microchip developed for detecting antibodies against plague-derived
antigens // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 393–398. doi: 10.15789/2220-7619-
2019-2-393-398

A MICROCHIP DEVELOPED FOR DETECTING ANTIBODIES AGAINST PLAQUE-DERIVED ANTIGENS

Utkin D.V., Kireev M.N., Guseva N.P., Kaplun G.A., Kuklev V.E., Osina N.A.

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. Currently available Russia-made preparations intended for serological plague diagnostics are usually aimed at detecting antibodies to single bacterial antigens in the blood serum. To improve reliability of the data obtained, it is rational to use test systems to simultaneously quantify antibodies to several immunodominant *Y. pestis* antigens. An opportunity of using biochip technology for quantifying specific antibodies to *Yersinia pestis* antigens was investigated. To do this, 5 commercially available sera, 35 blood sera obtained from individuals vaccinated with live plague vaccine collected 1, 4, 5, 18 months after immunization, as well as 5 sera obtained from healthy donors were analyzed. The objective of this work was to develop a biological microchip (immunochip) for detecting antibodies specific to *Y. pestis*-derived antigens. In particular, amino-modified slides were sensitized by immunodominant *Yersinia pestis*-derived antigens: capsule antigen F1, lipopolysaccharide (LPS), main somatic antigen (MSA), fibrinolysin, and pestin PP. Diagnostic specificity and sensitivity of the immunochip were assessed by using the approved homo- and heterologous immune-biological preparations and experimental animal sera. It was found that the immunochip demonstrated a 100% diagnostic efficiency. An opportunity of applying this immunochip to determine specific antibody profile in individuals vaccinated with live plague vaccine was estimated. A commercially available ELISA-AB-F1 of *Yersinia pestis* kit was used for comparison that allowed to detect antibodies to *Y. pestis* F1 antigen in 77.1% of vaccinated individuals within the examined time period covering between 1 to 18 months post-vaccination, at titer 1:160–1:2560. In contrast, using the immunochip resulted in detecting F1 antigen-specific antibodies in 91.4% of samples post-vaccination at titer 1:320–1:2560. Moreover, such immunochip additionally allowed to detect antibodies specific to the remainder of *Y. pestis*-derived LPS, MSA, pestin PP in 54.3%, 20%, 42% of vaccinated individuals, respectively. The percentage of positive seroconversion in individuals vaccinated with live plague vaccine was 77.1% based on the ELISA data, 91.4% — to the F1 antigen according to the immunochip data, and 94.3% — by analyzing an extended antigen panel. Combining multiple antigenic markers in our immunochip allowed to identify greater seroconversion among vaccinated people compared to a standard ELISA. Thus, the data obtained suggest that the proposed immunochip technology might be promising in assessing developing humoral immunity.

Key words: biochip, antibodies, antigens, plague, immunity.

В настоящее время актуальным является создание и внедрение в медицинскую практику новейших методов лабораторной диагностики, обладающих высокой технологичностью, производительностью, информативностью и низкой себестоимостью анализа для одновременного выявления и характеристики патогенов по ряду признаков, то есть проведения многопараметрического или многофакторного анализа. Перечисленным требованиям удовлетворяют диагностические тест-системы на основе биологических микрочипов (биочипов). Технология биологических микрочипов позволяет осуществлять анализ как генетических маркеров, так и иммунобиологических молекул — антигенов, антител. В настоящее время разработаны биологические микрочипы для выявления ДНК и антигенов возбудителей особо опасных бактериальных инфекционных болезней: чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза [5, 6, 7, 11]; сконструирован иммуночип для выявления антител к антигенам возбудителя холеры [8, 9]. В то же время отсутствуют диагностические тест-системы для осуществления многофакторного иммуносерологического анализа для выявления антител к антигенам возбудителя чумы на основе технологии биочипов. Современные отечественные препараты, предназначенные для серологической диагностики чумы, направлены, как правило, на выявление в сыворотке крови человека антител к одному антигену возбудителя —

к капсульному антигену Фракции 1 (F1) [2]. Фактически, определяется уровень антител к антигену F1 *Yersinia pestis*, что не всегда отражает истинную картину формирования гуморального иммунитета. В частности, отмечено наличие антител к антигену F1 у 30% здоровых доноров и низкий уровень антител к F1 у постоянно прививающихся живой чумной вакциной людей [4, 10]. Для повышения достоверности результатов анализа целесообразно применение тест-систем для одновременного определения уровня антител к нескольким иммунодоминантным антигенам *Y. pestis*.

В связи с этим, целью данной работы была разработка и апробация биологического микрочипа (иммуночипа) для выявления антител к антигенам возбудителя чумы.

Материалы и методы

При разработке иммуночипа в качестве сенситина использовали препараты иммунодоминантных антигенов *Y. pestis*: F1, липополисахарид (ЛПС), основной соматический антиген (ОСА), фибринолизин, пестин ПП. Антигены наносили в концентрации 1 мг/мл на аминомодифицированные слайды (Corning, США) методом контактной печати с использованием миниплоттера Xact Microarrayer (LabNEXT, США). Каждый антиген наносили в трех повторах (рис. 1) в виде 16 идентичных зон на одном слайде.

Иммобилизацию антигенов осуществляли в течение 20 мин при температуре 60°C с последующей обработкой блокирующим буфером (0,5% бычий сывороточный альбумин в 0,01 ммоль фосфатно-солевого буферного раствора [ФСБ]) в течение 30 мин при температуре 23–35°C. Слайды высушивали путем центрифугирования при 1000 об./мин в течение 1 мин.

Для контроля специфичности иммуночипа использовали препараты иммуноглобулинов диагностических чумных (РУ № ФСР 2008/02592-270409, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора); иммуноглобулинов диагностических псевдотуберкулезных (РУ № ФСР 2012/13947-101012, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора); сыворотку диагностическую туляремию (РУ № ФСР 2011/10029, ФКУЗ Иркутский НИПЧИ Роспотребнадзора); набор реагентов сывороток диагностических бруцеллезных anti-abortus и anti-melitensis (РУ № РЗН 2015/2181, ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора); сыворотки и асцитические жидкости мышей инбредной линии BALB/c, иммунизированных живой чумной вакциной и вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенным при температуре 28°C и 37°C.

В качестве клинического материала исследовали 35 сывороток крови людей, вакцинированных живой чумной вакциной (ЖЧВ), со сроками забора материала после вакцинации от 1 до 18 месяцев; 5 сывороток людей, не вакцинированных живой чумной вакциной (контрольная группа).

В качестве тест-системы сравнения использовали тест-систему иммуноферментную для выявления антител к чумному микробу «ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*» (РУ № ФСР 2012/13946-101012, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора).

Для выявления специфических антител в клиническом и биологическом материале использовали непрямой метод иммуноанализа. Исследуемые сыворотки вносили в лунки реакционных ячеек (Whatman, Великобритания) и инкубировали на термошейкере при температуре 37°C в течение 1 ч со скоростью вращения платформы 300 об./мин. После инкубации слайды отмывали троекратно ФСБ и вносили конъюгаты анти-IgG или анти-IgM антител с флуоресцентным красителем Alexa Fluor (Molecular Probes, США). Слайды инкубировали при температуре 37°C в течение 1 ч, отмывали троекратно ФСБ и высушивали центрифугированием при 1000 об./мин в течение 1 мин. Регистрацию и учет результатов осуществляли с помощью многоканального флуоресцентного сканера микрослайдов GenePix 4100A (Molecular Devices, США). Уровень флуоресценции считали положительным, если его значение превышало в 2 раза значение флуоресценции в зонах нанесения отрицательного контроля.

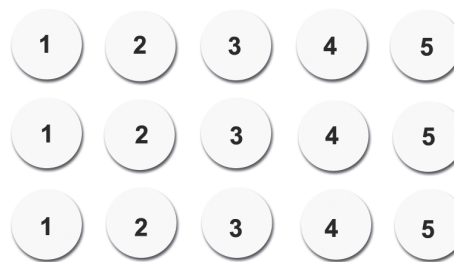


Рисунок 1. Схема размещения антигенов

Figure 1. A scheme depicting position of antigens

1 — F1, 2 — ЛПС, 3 — ОСА, 4 — фибринолизин, 5 — пестин ПП.
1 — F1, 2 — lipopolysaccharide, 3 — main somatic antigen, 4 — fibrinolysin, 5 — pestin PP.

Диагностическая чувствительность определялась как доля истинно положительных результатов к числу положительных проб. Диагностическая специфичность определялась как доля истинно отрицательных результатов к числу отрицательных проб.

Статистически рассчитывали достоверность различий между параметрами с уровнем значимости 0,95 с определением критерия Стьюдента (*t*). Доверительный интервал для доли оцениваемого параметра с 95% вероятностью рассчитывали по методу Уилсона с коррекцией [1] с использованием онлайн-калькулятора Wassar Stats: Web Site for Statistical Computation (<http://vassarstats.net/prop1.html>).

Результаты и обсуждение

По результатам иммунологического анализа при исследовании гомо- и гетерологичных сывороток и препаратов иммуноглобулинов диагностическая специфичность и чувствительность иммуночипа составила 100% с доверительным интервалом 80–100%.

Для оценки профиля специфических антител у вакцинированных живой чумной вакциной людей использовали иммуноферментную тест-систему «ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*» и разработанный иммуночип. Несмотря на то что основную роль в формировании иммунитета при чуме играет клеточное звено, косвенную оценку эффективности вакцинации чумной вакциной осуществляют путем определения поствакцинальных титров антител [12, 13]. Для выявления антител к возбудителю чумы используют иммуноферментную тест-систему «ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») [2]. В данной работе проведена сравнительная оценка применения ИФА-тест-системы, позволяющей выявлять антитела к антигену F1 *Y. pestis* и иммуночипа на основе 5 антигенов чумного микроба.

Образцы сывороток крови людей исследовали в разведениях от 1:40 до 1:5120. По результатам ИФА, титры антител к антигену F1 *Y. pestis* в сыворотках крови вакцинированных людей через 1 месяц после вакцинации колебались в преде-

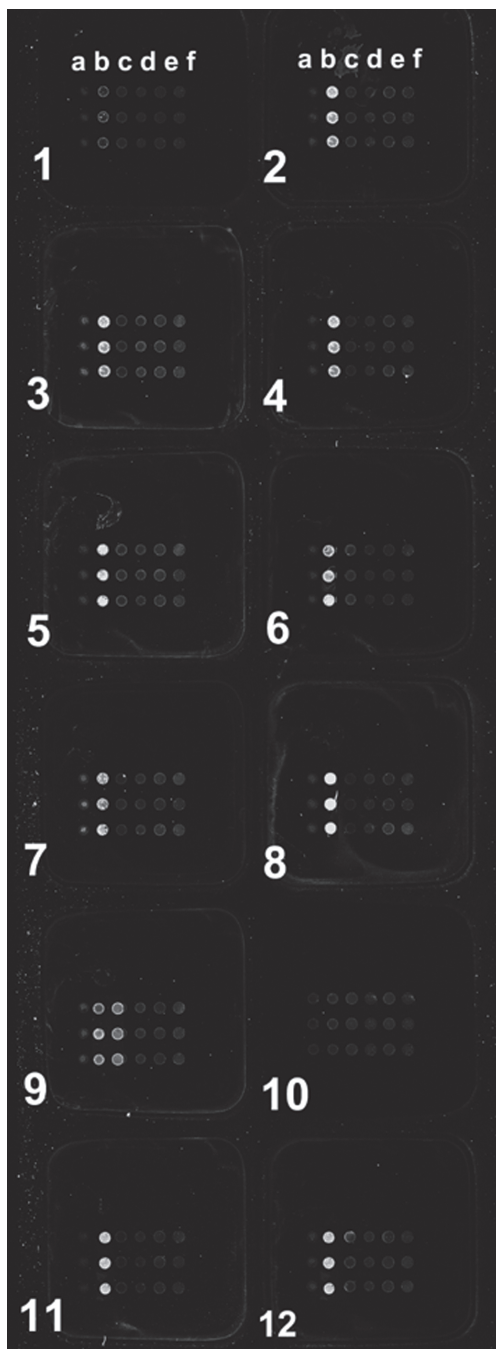


Рисунок 2. Флуоресцентный профиль иммуночипа. Анализ с сыворотками людей, вакцинированных живой чумной вакциной (2–9, 11, 12) и не вакцинированных (1, 10), в разведении 1:100

Figure 2. Immunochip fluorescent profile. Sera obtained from individuals vaccinated with live plague vaccine (2–9, 11, 12) and unvaccinated (1, 10) in at 1:100 dilution were analyzed

1–12 — номера исследуемых сывороток;
a-f — иммобилизованные антигены в пределах одного эррея: сорбционный буфер (a), F1 (b), 2 — ЛПС (c), 3 — ОСА (d), 4 — фибринолизин (e), 5 — пестин ПП (f).
1–12 — serial numbers of sera examined; a-f — antigens immobilized within a single array: sorption buffer (a), F1 (b), 2 — lipopolysaccharide (c), 3 — main somatic antigen (d), 4 — fibrinolysin (e), 5 — pestin PP (f).

лах 1:1280–1:2560, через 4–5 месяцев после вакцинации — на уровне 1:160–1:640, через 18 месяцев — 1:160–1:320. У 3 из 5 контрольных доноров (60%) обнаружены антитела к антигену F1 чумного микроба в титрах от 1:40 до 1:80.

По результатам анализа с использованием иммуночипа титр антител к антигену F1 *Y. pestis* в сыворотках крови вакцинированных людей соответствовал или был выше титров, установленных в ИФА: 1:1280–1:2560 — через 1 месяц после вакцинации, 1:320–1:1280 — через 4–5 месяцев после вакцинации, 1:320 — через 18 месяцев после вакцинации. В контрольной группе антитела к антигенам *Y. pestis* не выявлены (рис. 2). Полученные результаты подтверждают данные о высокой иммуногенности капсульного антигена F1 чумного микроба [10].

Применение ИФА-тест-системы «ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*» позволило определить наличие антител к антигену F1 в сыворотке крови у 16 вакцинированных людей из 19 (84,2%) через 1 месяц после вакцинации, у 10 из 13 (76,9%) — через 4–5 месяцев, в 1 пробе из 3 (33,3%) — через 18 месяцев в контрольной группе антитела не выявлены (табл.).

При анализе с использованием иммуночипа процент положительной сероконверсии к антигену F1 был выше и составил: 89,5% — через 1 месяц после вакцинации, 92,3% — через 4–5 месяцев, 100% — через 18 месяцев. Кроме того, у 54,3 и 22,9% людей выявлены антитела к ЛПС и ОСА чумного микроба соответственно (табл.). Липополисахарид *Y. pestis* представляет собой поверхностный антиген, состоящий из корового липополисахарида, характерного для бактерий в R-форме, и самостоятельно функционирующих в клетке O-боковых цепей, получивших название основного соматического антигена. На ранних сроках после вакцинации (через 1 месяц) выявлены антитела к гаптенизированным формам ЛПС и ОСА в составе пестина ПП у 42% доноров. Антитела к фибринолизину в титре 1:100 не обнаружены, что может объясняться низким уровнем антител за счет экранирования фибринолизина клетки поверхностными капсульными и соматическими антигенами [3].

По результатам работы установлено, что процент положительной сероконверсии в ИФА у лиц, вакцинированных ЖЧВ, составил 77,1% (доверительный интервал для генеральной совокупности с 95% вероятностью составил 59,4–89%). По результатам анализа с применением иммуночипа антитела к F1 выявлены в 91,4% случаев (доверительный интервал для генеральной совокупности с 95% вероятностью составил 75,8–97,8%). При использовании расширенной панели антигенов циркуляция антител к антигенам *Y. pestis* обнаружена у 94,3% доноров (доверительный интервал для генеральной совокупности с 95% вероятностью составил 79,5–99%). Применение нескольких антигенных маркеров в составе им-

Таблица. Количество серопозитивных проб при анализе в ИФА и с использованием иммуночипа

Table. The number of seropositive samples in ELISA and in the analysis using the immunochip

Исследуемая группа (срок после вакцинации) Study group (post-vaccination time points)	Количество исследованных проб Number samples examined	Количество положительных проб в ИФА (доля, доверительный интервал, %) Number of positive samples by ELISA (percentage; confidence interval, %)	Количество проб, имеющих антитела к антигенам <i>Y. pestis</i> , по результатам анализа с использованием иммуночипа (доля, доверительный интервал, %) Number of samples positive for antibodies against <i>Y. pestis</i> -derived antigens by using immunochip (percentage; confidence interval, %)			
			F1	ЛПС LPS	ОСА Main somatic antigen	всего серопозитивных проб total seropositive samples
1 месяц 1 months	19	16 (84,2; 59,5–95,8)	17 (89,5; 65,5–98,2)	12 (63,2; 38,6–82,8)	1 (5,3; 0,3–28,1)	18 (94,7; 71,9–99,7)
4–5 месяцев 4–5 months	13	10 (76,9; 46,0–93,8)	12 (92,3; 62,1–99,6)	5 (38,5; 15,1–67,7)	5 (38,5; 15,1–67,7)	12 (92,3; 62,1–99,6)
18 месяцев 18 months	3	1 (33,3; 1,8–87,5)	3 (100,0; 31,0–100,0)	2 (66,7; 12,5–98,2)	2 (66,7; 12,5–98,2)	3 (100,0; 31,0–100,0)
Всего Total	35	27 (77,1; 59,4–89,0)	32 (91,4; 75,8–97,8)	19 (54,3; 36,9–70,8)	8 (22,9; 11,0–40,6)	33 (94,3; 79,5–99,0)
Контрольная группа Control group	5	0 (0)	0	0	0	0

муночипа позволило выявить больший процент сероконверсии, чем при использовании ИФА, что согласуется с литературными данными [4]. Однако статистический анализ не выявил достоверных различий в результатах при использовании двух методов: критерий Стьюдента составил $t = 1,47$ — при анализе одного маркера, $t = 1,57$ — при анализе нескольких маркеров с критическим значением $t = 2,776$. Выявленная трансгрессия доверительных интервалов для данной выборки исследований также свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий между методами ИФА и иммуночиповой технологией.

Преимущество разработанного биочипа перед существующей ИФА-тест-системой — возможность выявления антител к соматическим антигенам возбудителя чумы.

В результате проведенных исследований разработан биологический микрочип для выявления антител к капсульному и соматическим антигенам возбудителя чумы. Применение иммуночипа позволяет осуществлять верификацию диагностических исследований, направленных на обнаружение специфических антител к антигенам возбудителя чумы для оценки формирования гуморального иммунитета.

Список литературы/References

- Гржибовский А.М. Доверительные интервалы для частот и долей // Экология человека. 2008. № 5. С. 57–60. [Grjibovskiy A.M. Confidence intervals for proportions. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2008, no. 5, pp. 57–60. (In Russ.)]
- Девдариани З.Л., Терешкина Н.Е., Тараненко Т.М., Киреев М.Н., Терехова И.В., Григорьева Г.В., Исляева М.Н., Ермаков Н.М., Виноградова Н.А., Малахаева А.Н. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-АТ-Ф1) *Yersinia pestis* // Проблемы особо опасных инфекций. 2013. № 1. С. 74–77. [Devdariani Z.L., Tereshkina N.E., Taranenko T.M., Kireev M.N., Terekhova I.V., Grigor'eva G.V., Islyaeva M.N., Ermakov N.M., Vinogradova N.A., Malakhaeva A.N. Results of modeling experiments in designing immuno-enzyme test-system for the detection of antibodies to *Yersinia pestis* F1 (ELISA-Ab-F1 *Yersinia pestis*). *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2013, no. 1, pp. 74–77. (In Russ.)]
- Евсеева В.В., Платонов М.Е., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Активатор плазминогена чумного микроба // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 27–36. [Evseeva V.V., Platonov M.E., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 27–36. doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-27-36 (In Russ.)]
- Ляпина А.М., Федорова В.А., Хижнякова М.А., Теплепнев М.В., Мотин В.Л. Рекомбинантные полипептиды как биомаркеры оценки иммунологической эффективности вакцинации живой чумной вакциной у людей // Медицинский академический журнал. 2012. Т. 12, № 3. С. 85–87. [Lyapina A.M., Fedorova V.A., Khizhnyakova M.A., Tepnepnev M.V., Motin V.L. Recombinant polypeptides as biomarkers for evaluating immunological efficacy of vaccination with live plague vaccine in humans. *Meditinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2012, vol. 12, no. 3, pp. 85–87. (In Russ.)]
- Никифоров К.А., Уткин Д.В., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А. Конструирование ДНК-чипа для дифференциации основного и неосновных подвидов и биоваров основного подвида *Yersinia pestis* // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. № 2. С. 32–35. [Nikiforov K.A., Utkin D.V., Kukleva L.M., Eroshenko G.A. Construction of a DNA-microarray for dif-

- ferentiation between the main and non-main subspecies and biovars of the main subspecies of *Yersinia pestis*. *Problemy osobno opasnykh infektsii* = *Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2017, no. 2, pp. 32–35. doi: 10.21055/0370-1069-2017-2-32-35 (In Russ.)]
6. Пудова Е.А., Маркелов М.Л., Дедков В.Г., Чеканова Т.А., Сажин А.И., Кирдяшклина Н.П., Бекова М.В., Девяткин А.А., Шипулин Г.А. Разработка набора реагентов в формате ДНК-чипа для генотипирования штаммов *Vibrio cholerae* // Клиническая лабораторная диагностика. 2014. № 5. С. 47–52. [Pudova E.A., Markelov M.L., Dedkov V.G., Tchekanova T.A., Sazhin A.I., Kirdiyashkina N.P., Bekova M.V., Deviyatkin A.A., Shipulin G.A. The development of reagents set in the format of DNA-chip for genetic typing of strains of *Vibrio cholerae*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2014, no. 5, pp. 47–52. (In Russ.)]
 7. Пудова Е.А., Чеканова Т.А., Маркелов М.Л., Дедков В.Г., Кирдяшклина Н.П., Карасева И.П., Сажин А.И., Зацепин Т.С., Уткин Д.В., Осина Н.А., Щербакова С.А., Шипулин Г.А. Разработка и апробация ДНК-чипа для индикации возбудителей особо опасных инфекций // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014. № 3. С. 13–19. [Pudova E.A., Chekanova T.A., Markelov M.L., Dedkov V.G., Kirdiyashkina N.P., Karaseva I.P., Sazhin A.I., Zatsepin T.S., Utkin D.V., Osina N.A., Shcherbakova S.A., Shipulin G.A. Development and testing of a DNA microarray for identification of particularly dangerous infectious pathogens. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy* = *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2014, no. 3, pp. 13–19. (In Russ.)]
 8. Уткин Д.В., Осина Н.А., Киреев М.Н., Спицын А.Н., Щербакова С.А. Биологический микрочип для выявления и многопараметрического анализа противохолерных антител. Патент РФ на изобретение. RUS 2528099 // Изобретения. Полезные модели: Бюллетень, № 25 от 10.09.2014. [Utkin D.V., Osina N.A., Kireev M.N., Spitsyn A.N., Shcherbakova S.A. A biological microchip for the detection and multiparameter analysis of the cholera antibodies. RF patent for the invention. RUS 2528099. *Izobreteniya. Poleznye modeli: Bulletin* = *Bulletin of the Invention. Useful models*, no. 25, 10.09.2014. (In Russ.)]
 9. Уткин Д.В., Осина Н.А., Спицын А.Н., Киреев М.Н., Громова О.В., Захарова Т.Л., Найденова Е.В., Куклев В.Е. Разработка биочипа для выявления противохолерных антител в сыворотке крови человека // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60, № 2. С. 50–53. [Utkin D.V., Osina N.A., Spitsyn A.N., Kireev M.N., Gromova O.V., Zakharova T.L., Naidenova E.V., Kuklev V.E. The development of biochip to detect anti-cholera antibodies in human blood serum. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 50–53. (In Russ.)]
 10. Фирстова В.В., Калмантаева О.В., Горбатов А.А., Кравченко Т.Б., Тюрин Е.А., Бондаренко Н.Л., Дятлов И.А., Караулов А.В. Оценка специфического гуморального и клеточного иммунитета у людей, периодически вакцинирующихся против чумы // Иммунология, аллергология, инфектология. 2015. № 3. С. 62–68. [Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Gorbatov A.A., Kravchenko T.B., Tjurin E.A., Bondarenko N.L., Dyatlov I.A., Karaulov A.V. Specific humoral and cellular immunity in humans periodically vaccinated against plague. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya* = *Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2015, no. 3, pp. 62–68. doi: 10.14427/jipai.2015.3.62 (In Russ.)]
 11. Goji N., MacMillan T., Amoako K.K. A new generation microarray for the simultaneous detection and identification of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* in food. *J. Pathogens*, 2012, vol. 2012, pp. 1–8. doi: 10.1155/2012/627036
 12. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, vol. 17, no. 7. pp. 1055–1065. doi: 10.1128/CVI.00131-10
 13. Williamson E.D., Oyston P.C.F. Protecting against plague: towards a next-generation vaccine. *Clin. Exp. Immunol.*, 2013, vol. 172, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.1111/cei.12044

Авторы:

Уткин Д.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории диагностических технологий ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Киреев М.Н., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Гусева Н.П., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории геномного и протеомного анализа ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Каплун Г.А., научный сотрудник лаборатории оперативной диагностики инфекционных болезней ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Куклев В.Е., к.м.н., зав. лабораторией диагностических технологий ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Осина Н.А., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной диагностики ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия.

Authors:

Utkin D.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Diagnostics Technologies, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;
Kireev M.N., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cholera Vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;
Guseva N.P., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Genomic and Proteomic Analysis, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;
Kaplun G.A., Researcher, Laboratory of Operative Diagnostics of Infectious Diseases, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;
Kuklev V.E., PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Diagnostics Technologies, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;
Osina N.A., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Diagnostics, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.11.2018
 Отправлена на доработку 04.03.2019
 Принята к печати 05.04.2019

Received 04.11.2018
 Revision received 04.03.2019
 Accepted 05.04.2019