

УДК 574.5(28)

НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ К *ESCHERICHIA COLI* ПРИ РАЗРАБОТКЕ ИЗДЕЛИЙ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА¹

*Г. Н. Ковалев*², *Ю. Г. Яновский*³, *Ю. Н. Карнет*⁴, *Е. И. Зарайский*⁵,
*Н. С. Снегирева*⁶, *И. Ф. Образцов*⁷

NEW TECHNOLOGY OF FABRICATION OF THE SPECIFIC ANTIBODIES TO
ESCHERICHIA COLI FOR WARES OF ECOLOGICAL MONITORING

Kovalev G.N., Yanovsky Yu.G., Karnet Yu.N., Zaraisky E.I., Sneguireva N.S., Obraztsov I.F.

In the article the express methods of indication and identification of bacterias are reviewed. The unified methodological principles of creation the express train — tests for detection of human noxious substances and objects in water are stated. We describe the technology of creation of antibodies for detection *E. coli*.

Введение

Вопросы обнаружения и идентификации бактерий в классической микробиологии можно считать решёнными, однако классические методики имеют существенный недостаток — они весьма продолжительны (от нескольких дней до нескольких недель). Для оперативного экологического мониторинга временные рамки весьма важны, поэтому актуальна разработка изделий, способных проводить экспресс-оценки. При этом желательна возможность реализации как инструментального, так и визуального контроля индикации бактерий.

По имеющимся литературным данным, экспрессные методики по времени контроля менее часа стали развиваться лишь в последнее десятилетие.

В данной работе в рамках проблемы экологического мониторинга дан анализ наиболее перспективных известных экспрессных

методик индикации и идентификации бактерий. Описан разработанный оригинальный метод получения антител, способных к обнаружению конкретного вида бактерий — *E. Coli*, для экспрессных оценок состояния окружающей среды.

1. Перспективные экспрессные методики индикации и идентификации бактерий

Известные экспрессные методики основаны на следующих принципах:

- 1) определение специфических летучих продуктов метаболизма бактерий;
- 2) определение характерных особенностей размеров и формы бактерий;
- 3) определение характерных особенностей нуклеиновых кислот бактерий;
- 4) определение характерных белковых микроучастков (эпитопов) на поверхности

¹Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 03-01-96602 юг).

²Ковалев Геннадий Николаевич, канд. хим. наук, старший научный сотрудник Института прикладной механики РАН.

³Яновский Юрий Григорьевич, д-р техн. наук, директор Института прикладной механики РАН.

⁴Карнет Юлия Николаевна, канд. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник Института прикладной механики РАН.

⁵Зарайский Евгений Ильич, научный сотрудник Института прикладной механики РАН.

⁶Снегирева Наталия Сергеевна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник Института прикладной механики РАН.

⁷Образцов Иван Филиппович, академик, научный руководитель Института прикладной механики РАН.

оболочек бактерий с помощью специфических иммунных реакций (метод иммунохроматографии).

Рассмотрим кратко некоторые особенности перечисленных выше методов.

В основе первого метода лежит определение специфических летучих продуктов метаболизма бактерий по результатам анализа газовых проб, находящихся в равновесии с жидкостью, содержащей бактерии. Как живые существа, микроорганизмы находятся в состоянии постоянного обмена с окружающей средой, выделяя продукты метаболизма, в том числе низкомолекулярные, с достаточно высокой упругостью паров. Набор такого рода продуктов специфичен для каждого типа (вида) бактерий (можно сказать, что каждый вид бактерий имеет свой особый «запах»). Поскольку концентрация микроорганизмов в подавляющем числе анализируемых проб очень мала и концентрации продуктов их метаболизма следует считать сверхмалыми, то физические (аппаратные) методы обнаружения следов паров должны быть сверхвысокочувствительными (в настоящее время достигнута очень высокая чувствительность таких методов — 1 г на 10^{12} г анализируемой пробы). Задача достижения высокой чувствительности аппаратных методов одновременно создаст и другую проблему, а именно: специфический слабый сигнал — «запах» бактерии (набор определённых химических веществ) — должен быть выделен на фоне сильных «шумов». Если речь идет об анализе речной воды, то «шумы» создают разнообразные загрязнения естественного и искусственного происхождения, например, продукты метаболизма множества других живых организмов, в том числе человека, промышленные стоки и т.д. Применительно к обсуждаемым системам эта задача решается с помощью системы детекторов, способных выделить специфический количественный отклик на определённые классы соединений или разделить смеси веществ (количество которых превышает многие сотни) на индивидуальные соединения. В этом методе характерный «образ» запаха выделяется с помощью компьютерного анализа.

Среди наиболее перспективных технических разработок, основанных на упомянутом принципе, можно отметить, во-первых, газовую хроматографию с использованием ультразвуковой детекции на основе кварцевого резонатора, а во-вторых, устройства с приме-

нением токопроводящих полимеров с селективной электропроводностью.

К числу таких приборов относится прежде всего американская портативная система GC/SAW — портативный газовый хроматограф [1, 2] с детектором скорости распространения поверхностно-акустической волны (SAW sensor). Система эффективно используется в судебно-химических и криминалистических лабораториях (чувствительность системы для летучих соединений — одна часть на триллион (ppt); используется предварительное концентрирование пробы, время анализа — несколько минут).

В случае использования разнородных токопроводящих сенсоров [3] детектирование паров исследуемого образца осуществляется с помощью матрицы, которая собрана из слоев («стопок») пористых и непористых полимерных мембран с различной электрической проводимостью и колонок, заполненных сенсорными полимерами. После сорбции веществ на разных слоях матрицы регистрируются изменения электропроводности слоев. Подобные устройства разрабатываются различными фирмами. Такой «селективный проводник» может быть использован для обнаружения наркотиков и взрывчатых веществ. «Селективный проводник» имеет чувствительность на уровне пикограмм вещества, легко калибруется, прост в обращении и не требует специального пробоотборника. Время анализа — 10–20 с.

Следует отметить, что описанные инструментальные методы вобрала в себя наилучшие технические достижения в области анализа следовых (крайне малых) количеств веществ. Соответствующее приборное оснащение запатентовано и стоит очень дорого. Сведения об отечественных аналогах такого рода приборов в литературе обнаружить не удалось.

В качестве примера приводим схему работы газового анализатора, позволяющего получить «отпечатки» запахов бактерий (рис. 1, [1]). Прибор дает графическую информацию о природе и интенсивности вредных примесей в пробах пара, газа или жидкости.

Подход, основанный на определении характерных особенностей размеров и формы бактерий, предполагает использование микроскопии. Проблемы, связанные с распознаванием образов и анализом изображений бактерий, проанализированы в работе [4], посвя-

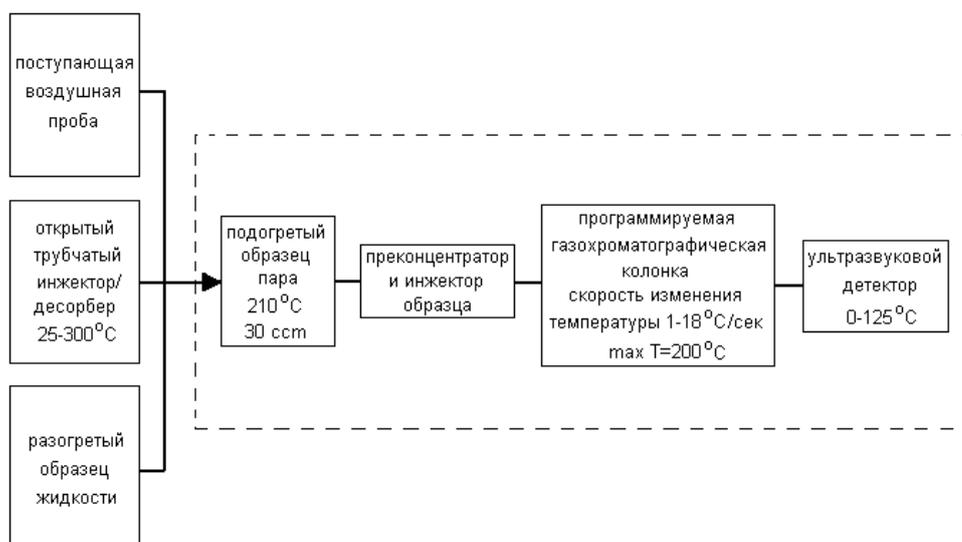


Рис. 1. Блок-схема комплекса на основе газового хроматографа и ультразвукового резонатора для анализа проб воздуха и паров различных веществ на предмет их идентификации

ценной автоматизированным методам изучения количественных структурных характеристик биологически активных композиционных материалов с помощью аппаратных комплексов «микроскоп – ЭВМ» и объектов, интегрированных в пористые носители. Этот метод индикации бактерий позволяет провести его «доработку» до экспрессного (или полужэкспрессного) уровня при условии предварительного концентрирования клеток из воды, например, микрофильтрацией. В качестве развития этого направления возможно использование атомно-силовой микроскопии, не требующей подготовки клеток к микроскопическому исследованию [5]. В данном случае имеется в виду анализ содержимого воды сразу после фильтрования, а не после длительного «прорастания» бактерий в колонии на питательных средах, как это делается в классических микробиологических тестах.

Третий метод относится к молекулярно-биологическим и основан на определении характерных особенностей нуклеиновых кислот бактерий. Подобный анализ связан с генной инженерией и базируется на изучении полимеразных цепных реакций (ПЦР) и гибридизации дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК-гибридизация). Он также позволяет распознавать бактерии, что было продемонстрировано при работе с особо опасными инфекциями [6]. Однако эти реакции, будучи

также весьма точными, протекают очень медленно, и анализы занимают часы или сутки.

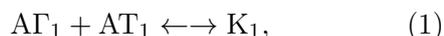
Наконец, еще одно направление основано на методе иммунохроматографии (определении характерных белковых микроучастков (эпитопов) на поверхности оболочек бактерий с помощью специфических (антиген + антитело, «ключ» + «замок») иммунных реакций). Это направление весьма перспективно, поэтому остановимся на нем более подробно.

Условно разделим понятие «иммунохроматография» на две части — иммунологическую и хроматографическую. Рассмотрим сначала «иммунологическую» часть на примере иммунизации животных.

Основой иммунологических реакций является взаимодействие специфических биополимеров (белков, пептидов, гликоконъюгатов, гипопотеидов и гаптенных на природных и искусственных носителях), которые называются антигенами (АГ), с антителами (АТ).

При попадании в организм инородной частицы (например, бактерии *E. coli*) организм теплокровного животного сначала «обследует» ее на чужеродность. Если частица распознана как чужеродная (АГ), иммунная система запускает каскад реакций, в которых участвуют различные звенья гуморального и клеточного иммунитета, приводящий к выработке большого количества специфических иммуноглобулинов к иммуногенным сайтам

бактерии [7]. Физико-химическое взаимодействие отдельного эпитопа (обозначим его как $АГ_1$) и специфичного к нему антитела (обозначим его как $АТ_1$) описывают классическим способом в рамках обратимой реакции, подчиняющейся закону действующих масс, как



где $К_1$ — продукт взаимодействия, называемый комплексом, конъюгатом и т.п. Указанная реакция может быть охарактеризована количественно в рамках классических представлений о свободной энергии, энтальпии и энтропии. Типичными для изменений свободной энергии можно считать значения от -25 до -50 кДж/моль, а для теплоты, выделяющейся при образовании комплекса, примерно 40 кДж/моль.

Приведенные цифровые характеристики не являются необычными для классической органической химии, однако рассмотренная реакция в высшей степени специфична, а именно данное антитело (АТ) распознает только «свой» специфичный антиген (АГ) среди многих сотен и тысяч других.

Эта особенность выгодно отличает иммунные методы от других способов идентификации бактерий. Действительно, для повышения надежности определений выберем так называемую двухсайтовую схему анализа, т.е. будем распознавать бактерию по двум разным АТ к ее двум разным эпитопам по методу, близкому к используемому в диагностике состояния беременных женщин [8, 9]. Уровень ошибки каждого АТ (случайное образование комплекса на «чужом» эпитопе) принимают равным 3% [7] (по-видимому, сильно завышенное значение). По теории вероятностей при двухсайтовом анализе уровень ошибки должен быть менее 0,001. Таким образом, в плане идентификации природы бактерий иммунохроматографический метод следует считать практически безошибочным.

Другое несомненное преимущество рассматриваемого метода — использование осуществляемой в теплокровном организме фантастической точности синтеза антител в плане их химического состава и стереометрии. Несмотря на все достижения химии и кибернетики, искусственное химическое создание АТ в лабораторных условиях в настоящее время невозможно. Более того, не исследован до конца механизм получения антител к наи-

более специфичным эпитопам, особенно если они низкоиммуногенны.

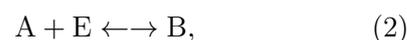
Кратко ознакомившись с некоторыми особенностями работы иммунной системы, рассмотрим наиболее важные направления в исследованиях, связанных с получением антител. Выделим два наиболее перспективных:

1) создание новых методик выделения наиболее эффективных АТ (аффинная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография);

2) разработка способов тиражирования выделенных АТ (получение гибридов и моноклональных антител).

Проблема визуализации результатов иммунохимической реакции представляется весьма актуальной. Взаимодействие, названное нами реакцией 1, является физическим (или физико-химическим) в том смысле, что в нем не появляются дополнительные продукты реакции и не происходит резкого изменения свойств системы (за исключением того, что комплекс имеет несколько меньшую растворимость по сравнению с исходными компонентами). Это обстоятельство крайне затрудняет его количественное изучение и, в частности, визуализацию.

Для пояснения сравним иммунохимический анализ с ферментным, который значительно легче поддается визуализации [10] и может быть представлен схемой



где А — вещество, наличие которого следует установить; Е — фермент (энзим); В — результирующее соединение.

В таблице приведены характеристики описанных экспрессных (или полуживых) методов определения бактерий.

2. Разработка антител, способных к обнаружению конкретного вида бактерий — *E. coli*

Сопоставительный анализ характеристик методов (см. таблицу) показывает перспективность и целесообразность создания биосенсоров на основе иммунохроматографического анализа. Метод хорошо зарекомендовал себя в медицине [8, 9], при анализе вирусных заболеваний сельскохозяйственных растений [11]. В данной работе представлен материал по разработке экспресс-теста, основанного на иммунохроматографическом анализе, особенности

Т а б л и ц а

Характеристики неклассических методов индикации и идентификации бактерий

Характеристики методов	Методы			
	Анализ запаха	Микроскопия	Молекулярно-биологический	Иммунохроматография
Быстродействие	Менее нескольких минут	От нескольких минут до нескольких часов	Несколько часов	Несколько минут
Специфичность	Нет	Нет	Очень высокая	Очень высокая
Возможность изучения другого объекта	Да	Да	Нет	Нет
Возможность использования в полевых условиях	Дорогостоящая переносная установка (до 30 кг)	Нет	Может быть определена при разработке	Полная (визуальное бесприборное наблюдение)
Стоимость оборудования	Очень высокая	Очень высокая	Высокая (на стадии разработки)	Высокая (на стадии разработки)
Возможность реализации в России	Практически отсутствует	Может быть определена при разработке	Может быть определена при разработке	Да

которого состоят, прежде всего, в создании антител для исследуемого объекта и в изучении микромеханики движения биополимеров и их комплексов в специальных пористых носителях.

Изделия для иммунохроматографического анализа являются разновидностью биосенсоров [12]. Известные иммунохроматографические биосенсоры [9, 11] представляют собой достаточно сложную конструкцию, основную часть которой составляют биологически активные композиционные материалы, содержащие и биологический компонент (маркер-антитело или комплекс биологического происхождения), и носитель из полимера. Структура последнего должна обеспечивать движение всех участвующих в иммунной реакции веществ — маркеров и тех объектов, которые они способны обнаруживать. Достигнутый на сегодняшний день уровень знаний недостаточен для развития и создания технологии производства биосенсоров нового поколения. Необходимы дополнительные исследования в этой области [12].

С учетом изложенного авторами [12] были поставлены следующие задачи:

а) изучение свойств поверхностей синтетических и природных пленок, мембран и т.д., содержащих интегрированные в их структуры молекулы биополимеров — «датчики»;

б) исследование конденсированного состояния биополимеров (белков, нуклеиновых

кислот и т.д.) в качестве «датчиков» (далее — «антигенов») и принципов работы биологически активных соединений в таких системах;

в) разработка принципов усиления сигналов и миниатюризации аналитических устройств для индикации иммунохроматографических реакций.

Анализ структурных особенностей носителей — пленок и мембран проводился в работах [13, 14]. В соответствии с общей стратегией разработки экспресс-тестов для экологического мониторинга, предложенной в [12], далее кратко описывается основной иммунологический этап работ по созданию изделия для экспресс-контроля, а именно антител, способных установить наличие «опасного» объекта.

Применение иммунохроматографии для диагностики различных инфекций привело к созданию иммунохроматографических датчиков для обнаружения части патогенных микроорганизмов [15]. Так, в Норвегии удалось контролировать большое количество водоемов на наличие туляремии при сравнительно низких затратах с помощью подобных тест-полосок. Простота анализа и возможность его проведения в нескольких участках каждого водоема позволили в 2000 г. выявить два очага заражения и своевременно принять противоэпидемические меры.

Из анализа предыдущей части работы, касающейся иммунохроматографии, ясно, что приступать к разработке иммунохроматогра-

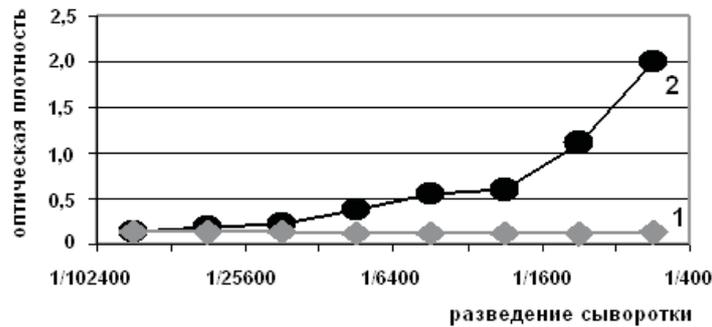


Рис. 2. Оценка качества сыворотки против *E. coli* в иммуноферментном анализе: 1 — 0 КОЕ; 2 — 100 млн КОЕ

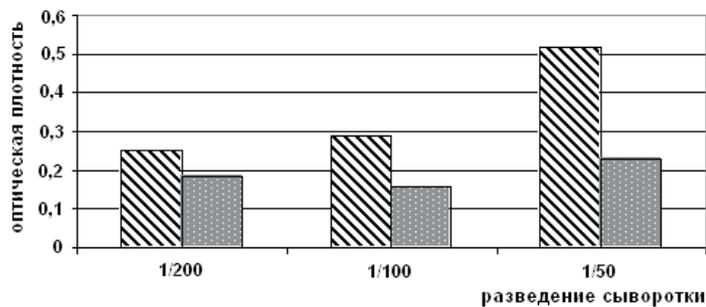


Рис. 3. Чувствительность иммуноферментного анализа на *E. coli*: светлые точки по темному фону — 0 КОЕ; штриховка — 100 млн КОЕ

фического изделия можно только после получения сыворотки крови животных, подвергавшихся иммунизации. Кроме того, важно обеспечить безопасные условия работы иммунологов. Иммунохроматографическая модель была избрана как наиболее перспективная для изделия, удовлетворяющего требованиям по экспресс-диагностике микробных антигенов, в том числе и АГ *E. coli*.

Разработана также схема конструкции экологического теста, включающая носитель для конъюгата специфических антител с коллоидными частицами, контактирующую с ним микропористую мембрану из нитрата целлюлозы, и отсасывающего материала для удаления избытка продуктов реакции [13].

В качестве антител, используемых в реакции индикации *E. coli*, были выбраны аффинные антитела против поверхностных антигенов *E. coli* и аффинные антитела против иммуноглобулинов мыши, используемые как для контроля, так и для отработки иммунохроматографических методик. Для получе-

ния аффинных антител против *E. coli* был выделен штамм *E. coli*, не инфекционный для человека, но обладающий практически полным спектром антигенов *E. coli*: XL1-blue, генотип supE44 hsd R17 recA1 endA1 gyrA46 thi rel A1 lac F'[proAB+lacY^q lacZΔM15 Tn(tet^r)]. Моноспецифические антитела были получены при помощи четырехкратной иммунизации кроликов данным штаммом. Первую иммунизацию проводили смесью 5×10^8 микробных телец с полным адьювантом Фрейнда подкожно в пять точек. Дальнейшие иммунизации проводили подкожно в две точки смесью 2×10^8 микробных телец с неполным адьювантом Фрейнда. Начиная со второй иммунизации, через 10 дней после инъекции проводили контроль сыворотки кроликов методом иммуноферментного анализа (ИФА) [7]. Контроль реакции осуществляли на сканирующем спектрофотометре марки Labsystems-MS для 96 луночных планшетов при длине волны 492 нм. Сыворотку считали пригодной

для получения антител, если ее титр составлял не менее $1/10^5$.

На рис. 2 представлен результат непрямой иммуноферментной реакции гипериммунной сыворотки против *E. coli*. АГ наносили в лунки плашки в концентрации 100 млн бактериальных телец (КОЕ). Из рис. 2 видно, что титр данной сыворотки — примерно $1/10^6$. Чувствительность реакции с такой сывороткой составила 100 КОЕ/мл (рис. 3). Если учесть, что в лунки наносили по 100 мкл сыворотки, можно считать, что данный подход приближается к наиболее чувствительному культуральному методу. Для получения аффинных антител клетки *E. coli* мышинный иммуноглобулин, изготовленный двойным высаливанием 50% сульфатом аммония из сыворотки мышей линии Balb/C, иммобилизовали на колонках, содержащих BrCN-сефарозу (бром-циан-сефарозу) из расчета 10 мг белка на 1 г сорбента.

Через колонки пропускали иммунные сыворотки и специфические иммуноглобулины, сепарировали с помощью реакции антиген-антитело на колонке. Чистые аффинные антитела получали после многократной промывки колонки фосфатно-солевым буфером (рН 7,3) путем элюции цитратным буфером (рН 2,4). Раствор антител нейтрализовали при помощи сухого Триса, доводя до рН 7,2–7,4.

Для удаления антител к перекрестным эпитопам раствор антител против *E. coli* смешивали с убитой культурой *Salmonella typhimurium*, имеющей максимально близкий к *E. coli* антигенный состав. Затем клетки *Salmonella* удаляли центрифугированием, получая максимально специфичные аффинные антитела. Для получения аффинных антител против мышинных иммуноглобулинов дополнительную сорбцию не проводили.

Полученные антитела сорбировали на частицах коллоидного золота для получения используемого в иммунохроматографии конъюгата.

Было исследовано несколько образцов коллоидного золота, отличающихся по размерам частиц. Оптимальным размером при использовании коллоидного золота для связи с антителами к первому эпитопу обладали частицы, лежащие в диапазоне 20–100 нм. При меньшем размере частиц ухудшались оптические свойства конъюгата. При большем размере коллоидный раствор становился неста-

бильным и твердая фаза быстро выпадала в осадок.

Для визуализации реакции в иммунохроматографии служит образование комплекса «антиген-антитело-коллоидное золото» или «антитело-антиген-антитело-коллоидное золото». Визуализация происходит в определенной области иммунохроматографического стрипа (полоски), называемой тест-зоной, или в области, называемой зоной контроля.

При разработке контрольной зоны были отработаны концентрации наносимого на нитрат целлюлозы белка. Оптимальным оказался диапазон 0,3–1,0 мг/мл. При концентрации менее 0,3 мг/мл сигнал ослаблялся из-за недостатка антител. При увеличении концентрации сигнал также ослаблялся, но по другой причине — из-за эффекта нарушения стехиометрических соотношений (так называемый эффект прозоны).

Заключение

На основании анализа наиболее перспективных методик индикации и идентификации бактерий для экспрессной оценки предложен подход, основанный на иммунохроматографическом тесте.

На основе стратегии создания изделий для мониторинга в экологии, сформулированной и рассмотренной в работах [10, 12], разработаны все этапы новой технологии получения иммунологического теста для частного случая индикации бактерий *E. coli*. Технология включает получение антител на основе иммунизации опытных животных штаммом *E. coli*, не опасным для человека, проверку их сыворотки классическим методом иммуноферментной спектрофотометрии и получение чистых аффинных антител против *E. coli*.

На следующей стадии работы, после наработки информации о вязких свойствах конъюгатов, будет предложен алгоритм расчета времени движения иммунологических компонентов при работе тест-системы с учетом структуры последней.

Литература

1. Staples E. J. Field analysis method using a novel electronic nose as an environmental tool // Proceedings of the 1998 IEEE International Ultrasonics Symposium. Sendai, Japan, 1998. P. 124–132.

2. United States Patent 6,212,938, April 10, 2001. Method of detecting smell of a vapor and producing a unic visual representation thereof / E. Staples.
3. United States Patent 5,928,609, July 27, 1999. Odor sensor / T.D. Gibson, P. Puttick, D.N. Hulbert, R.W. Marshall.
4. Яновский Ю. Г., Карнет Ю. Н., Ковалев Г. Н., Ющенко В. С., Снегирева Н. С. Автоматизированные методы изучения количественных структурных характеристик биологически активных композиционных материалов // Механика композиционных материалов и конструкций. 2002. Т. 8. № 2. С. 227–244.
5. Яминский И. В. Различия клеточной поверхности гибридных бактерий *Escherichia coli* K12, наследующих *rbf a3,4* ген *Shigella flexneri*, выявляемые с помощью атомно-силовой микроскопии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1997. № 6. С. 15–19.
6. Зарайский Е. И., Маркин А. В., Снегирева Н. С. Способ количественной оценки цепной полимеразной реакции // Мониторинг, аудит и информационное обеспечение в системе медико-экологической безопасности: XI Междунар. симпозиум. Испания, 2002. С. 295–297.
7. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
8. Фукс Б. Б., Сидельникова В. М., Зарайский Е. И. и др. Иммунохроматографический тест для определения наличия околоплодных вод во влагалищном секрете беременных женщин с целью диагностики разрыва фетальных мембран // Неинвазивная диагностика: Тез. докл. 2-го симпозиума. М., 1995. С. 69.
9. Сидельникова В. М., Болтовская М. Н., Степанов А. А., Зарайский Е. И. Новый метод диагностики преждевременного излития плодных вод // Акушерство и гинекология. 1996. № 6. С. 236–239.
10. Пат. 2182929 РФ, 2002. Комплект для определения ингибиторов холинэстеразы / Э. Т. Гайнулина, Ю. Г. Яновский и др.
11. Блинцов А. Н., Снегирева Н. С., Бобкова А. Ф., Дзантиев Б. Б., Изумрудов В. А. Ферментативный иммунохроматографический анализ растительных вирусов // ДАН. 1997. Т. 356. № 2. С. 264–267.
12. Варфоломеев С. Д., Евдокимов Ю. М., Островский М. А. Сенсорная биология, сенсорные технологии и создание искусственных сенсорных систем // Вестник РАН. 2000. Т. 70. № 2. С. 99–111.
13. Ковалев Г. Н., Зарайский Е. И., Ковалев А. Г., Снегирева Н. С. Некоторые закономерности движения белковых растворов под влиянием сил поверхностного натяжения в горизонтально расположенных микропористых полосках из нитрата целлюлозы // Механика композиционных материалов и конструкций. 2003. Т. 9. № 3. С. 321–332.
14. Ковалев Г. Н., Столяров С. И., Снегирева Н. С., Зарайский Е. И. Пути использования мембранной технологии в подготовке и анализе воды // Международный год воды 2003: Материалы XIII Междунар. симпозиума. Австрия, М., 2003. С. 194–199.
15. Berdal B. P., Mehl R. et al. Field detection of *Francisella tularensis* // Scand J. Infect. Dis. 2000. Vol. 32. No 3. P. 287–291.

Статья поступила 1 июня 2004 г.

Института прикладной механики РАН

© Ковалев Г. Н., Яновский Ю. Г., Карнет Ю. Н., Зарайский Е. И., Снегирева Н. С., Образцов И. Ф., 2004