

В.В.Евдокимова, Л.П.Алексеева, В.П.Зюзина, О.Ф.Кретенчук, М.Э.Яговкин

## ИЗУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К МЕМБРАННОМУ БЕЛКУ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ, В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

**Цель** – разработка пероксидазного конъюгата на основе МКА H2F6 и изучение возможности его использования для выявления *tcp*<sup>+</sup> штаммов холерных вибрионов O1/O139 серогрупп в прямых методах ИФА. **Материалы и методы.** В работе использовали гибридный клон H2F6, синтезирующий в культуральную среду моноклональные антитела, специфичные к белку наружной мембраны холерного вибриона. **Результаты и выводы.** На основе МКА сконструирован пероксидазный конъюгат, позволяющий выявлять *tcp*<sup>+</sup> штаммы *V. cholerae* O1 и O139 в прямом ТИФА и дот-ИФА. Испытания препарата на наборе штаммов холерных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов показали его специфичность в отношении *V. cholerae* O1 и O139. Моноклональный пероксидазный конъюгат H2F6 может быть использован для детекции в иммуноферментных методах эпидемически значимых штаммов холерных вибрионов O1/O139 серогрупп.

**Ключевые слова:** холерный вибрион, моноклональные антитела, иммуноблоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ, дот-иммуноанализ, пероксидазный конъюгат.

Корреспондирующий автор: Евдокимова Вероника Вячеславовна, e-mail: nika-evd@yandex.ru.

V.V.Evdokimova, L.P.Alekseeva, V.P.Zyuzina, O.F.Kretenchuk, M.E.Yagovkin

## The Study of Diagnostic Potential of Monoclonal Antibodies Specific to the Membrane Protein of Cholera Agent in Enzyme-Linked Immunoassay

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Objective** of the study was to develop peroxidase conjugate on the base of monoclonal antibodies (MCA) H2F6 and to study the possibility of its application for the detection of *tcp*<sup>+</sup> *Vibrio cholerae* O1/O139 strains using direct ELISA methods. **Materials and methods.** Utilized for the investigation was the hybrid H2F6 clone, which synthesized monoclonal antibodies specific to the outer membrane protein of cholera vibrio into culture medium. **Results and conclusions.** Peroxidase conjugate was designed on the base of MCA which allows for the detection of *tcp*<sup>+</sup> *V. cholerae* O1 and O139 strains in direct solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay and dot-ELISA. The preparation was tested on a group of strains of *V. cholerae* and heterologous microorganisms and showed specificity in relation to *V. cholerae* O1 and O139. Monoclonal peroxidase conjugate H2F6 can be used for the detection of epidemiologically significant *V. cholerae* O1/O139 strains by means of immune-enzyme methods.

**Key words:** cholera vibrio; monoclonal antibodies; immunoblotting; solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay; dot-immunoassay; peroxidase conjugate.

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

**Corresponding author:** Veronika V. Evdokimova, e-mail: nika-evd@yandex.ru.

**Citation:** Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Zyuzina V.P., Kretenchuk O.F., Yagovkin M.E. The Study of Diagnostic Potential of Monoclonal Antibodies Specific to the Membrane Protein of Cholera Agent in Enzyme-Linked Immunoassay. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:45–48. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-45-48

Возбудитель холеры продолжает представлять угрозу для общественного здравоохранения, что диктует необходимость разработки новых методов и средств диагностики. Создание современных иммунодиагностических препаратов невозможно без высокоактивных специфических антител. Уникальными преимуществами обладают моноклональные антитела (МКА) – они направлены к строго определенной антигенной детерминанте, имеют один изотип, обладают одинаковыми физико-химическими характеристиками и сродством к антигену, при наличии гибридом-продуцентов их можно получать по мере необходимости в неограниченном количестве. На сегодняшний день известно много зарубежных и отечественных публикаций, касающихся получения моноклональных антител к различным

поверхностным структурам холерного вибриона и его факторам патогенности. На основе МКА сконструированы высокоэффективные тест-системы: иммуноферментные [1, 2, 4, 16, 20], иммунохроматографические [11, 17, 18] и иммуносенсорные [12]. Нами на базе Ростовского-на-Дону противочумного института получен гибридный клон H2F6, продуцирующий в культуральную среду МКА, специфичные к мембранному белку OmpU и/или OmpT холерных вибрионов O1, O139 [5]. При оценке в иммуноферментном анализе диагностической значимости МКА H2F6 на наборе штаммов холерных вибрионов O1/O139 серогрупп, а также гетерологичных и близкородственных микроорганизмов, установлено, что антитела взаимодействуют только с *tcp*<sup>+</sup> штаммами *V. cholerae* O1 и O139. По данным Референс-центра

по мониторингу за холерой, за период с 2007 по 2015 год в субъектах Российской Федерации из воды поверхностных водоемов изолированы 33 штамма *V. cholerae* O1 ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>+</sup> в Ростовской области (2007 и 2015 гг.), Республике Калмыкия (2007, 2011–2015 гг.), Алтайском (2011 г.) и Хабаровском (2013 г.) краях. Такие штаммы холерных вибрионов не обладают эпидемическим потенциалом, но могут вызывать спорадические случаи и локальные вспышки [9] за счет продукции ТСП, кодируемых кластером генов в составе острова патогенности VPI, и других факторов патогенности, детерминанты которых обнаружены в их геномах в различных сочетаниях [8]. Ежегодное выделение атоксигенных холерных вибрионов указывает на необходимость выявления потенциальных и реальных рисков контаминации холерными вибрионами O1/O139 серогрупп водных объектов и их устранения [10]. Цель данной работы – получение пероксидазного конъюгата на основе МКА H2F6 и изучение возможности его использования для выявления *tcp*<sup>+</sup> штаммов холерных вибрионов O1/O139 серогрупп в прямых методах ИФА.

### Материалы и методы

В работе использовали штаммы, полученные из коллекции Музея живых культур института: 32 штамма *V. cholerae* O1, 12 штаммов *V. cholerae* O139, 4 – *V. cholerae* не O1/не O139, 2 – *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 единиц (ОСО 42-28-85П), соответствующего года выпуска, эквивалентных концентрации  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл. Взвеси культур инактивировали на водяной бане в течение 30 мин.

Источником МКА служили культуральные жидкости, накопленные при многократном пассировании *in vitro* гибридомы-продуцента H2F6. Выделение иммуноглобулиновой фракции из культуральных жидкостей осуществляли преципитацией сульфатом аммония [6] с последующим диализом.

Электрофорез образцов проводили по методике U.K.Laemmli [14] в пластинах 12,5 % полиакриламидного геля размером 70×100×0,7 мм в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) при постоянном напряжении на приборе Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad Laboratories, inc., США). Полусухой перенос образцов из геля на нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) с диаметром пор 0,45 мкм проводили на приборе Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories inc., США). Для окрашивания белковых фракций на мембране использовали краситель Ponceau S (Reanal, Budapest). Постановку иммуноблоттинга осуществляли как описано Н. Towbin *et al.* [19]; мембрану обрабатывали МКА, а затем инкубировали в рабочем растворе антимишиного конъюгата (Goat Anti-mouse IgG H+L, HRP-conjugated, MP

Biomedicals), специфические полосы проявляли диаминобензидином (Aldrich).

Метку МКА ферментом проводили по методу P.K.Nakane *et al.* [15] в соотношении 2:1, используя пероксидазу хрена (ПХ) с RZ (Reinheitszahl – показатель чистоты) не менее 3,0 (активность >250 ед/мг, хроматографически чистая, обессоленная, для иммунологии, «ДИА-М»). Очистку конъюгатов от несвязавшейся пероксидазы проводили путем диализа против 0,01 М фосфатного буфера. Рабочее разведение ПХ-конъюгатов определяли методом шахматного титрования в двухкомпонентной реакции: контрольный антиген (АГ) АГ+МКА, меченные ферментом.

Постановку прямого твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) в полистироловых планшетах осуществляли по общепринятой методике [7]. В качестве хромогена использовали 3,3'-5,5'-тетраметилбензидин (AppliChem, Германия). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре BioTek EL\*800 (BioTek Instruments, США) при длине волны 450 нм (референс-волна 630 нм).

Для постановки дот-ИФА по стандартной методике [7] использовали НЦМ с диаметром пор 0,45 мкм (Bio-Rad). После проведения реакции специфические пятна проявляли хромогеном диаминобензидином (Aldrich), активированным 0,1 мл 3,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Все исследования проводили не менее чем в трех повторностях. При анализе и обобщении результатов планшетного ИФА использованы методы, описанные И.П.Ашмариным [3].

### Результаты и обсуждение

На первом этапе работы для приготовления препаративных количеств МКА клетки гибридомы H2F6, стабильно продуцирующей специфические иммуноглобулины, тиражировали *in vitro* в чашках Петри и культуральных матрасах. Оценку интенсивности антителопродукции проводили с помощью тестирования в ТИФА образцов среды из лунок с гибридомой. После накопления культуральной жидкости (КЖ) гибридомы H2F6 проводили выделение МКА с помощью метода сульфатного осаждения (при 50 % насыщения). В полученных препаратах определили содержание белка равное 5–8 мг/мл и методом непрямого ТИФА установили специфическую активность, которая составляла 1:4000–1:8000.

Эпитопную направленность МКА определяли в иммуноблоттинге, используя лизаты клеток холерных вибрионов (рис. 1). В результате обработки мембраны МКА H2F6 специфические белковые полосы обнаружены на уровне маркерных белков 38–42 кДа у штаммов *V. cholerae cholerae*, *V. cholerae* El Tor (*tcp*<sup>+</sup>) и *V. cholerae* O139 (*tcp*<sup>+</sup>), что соответствует мембранным белкам OmpU и/или OmpT холерного вибриона.

Затем очищенные специфические моноклональ-

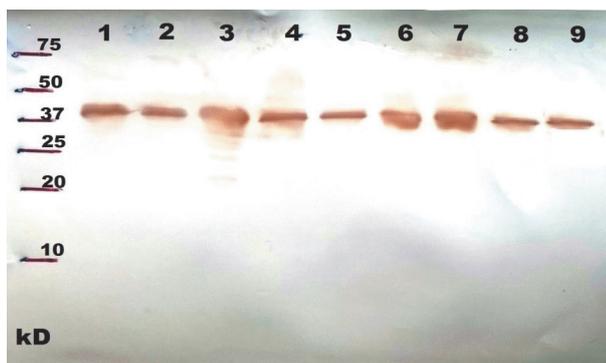


Рис. 1. Иммуноблоттинг клеточных лизатов холерных вибрионов с МКА H2F6:

1–3 – штаммы *Vibrio cholerae cholerae*: 1401, 10353, 13571; 4–6 – штаммы *Vibrio cholerae* El Tor (*tcp*<sup>+</sup>): 13020, 18895, 18780; 7–9 – штаммы *Vibrio cholerae* O139 (*tcp*<sup>+</sup>): 16064, 16485, 17916

ные иммуноглобулины H2F6 конъюгировали с пероксидазой хрена, в результате чего получено две серии препаратов. Для каждой серии конъюгатов проверяли способность связываться со специфическим антигеном и возможность неспецифической сорбции. Методом прямого ТИФА определили максимальное разведение конъюгатов, при котором наблюдалось положительное взаимодействие клеток холерного вибриона с МКА, а именно, препараты титровались до разведения 1:64–1:128. Для дальнейших экспериментов использовали их в рабочем титре 1:32 при отсутствии неспецифической сорбции.

Специфичность полученных конъюгатов оценивали на наборе штаммов холерных вибрионов, а также близкородственных и гетерологичных микроорганизмов. Подобраны культуры *V. cholerae* O1 и O139 с генотипами *tcp*<sup>+</sup> и *tcp*<sup>-</sup>. В таблице приведены результаты прямого ТИФА, которые подтверждают установленную в предыдущих опытах [5] специфичность МКА H2F6 в отношении *tcp*<sup>+</sup> штаммов *V. cholerae* O1, O139. Кроме того, исследуемые антитела взаимодействуют как с клетками El Tor штаммов, так и классических холерных вибрионов, что указывает на сходство у этих биоваров антигенной структуры мембранного порина, к которому направлены МКА H2F6.

Взаимодействие холерных вибрионов O1/O139 серогрупп с пероксидазным конъюгатом H2F6 в прямом ТИФА

Бактериальные штаммы (обеззараженные кипячением)	Количество исследуемых штаммов	Количество штаммов, положительно взаимодействующих в ТИФА с ПХ-МКА H2F6
<i>V. cholerae cholerae tcp</i> <sup>+</sup>	8	8
<i>V. cholerae</i> El Tor <i>tcp</i> <sup>+</sup>	16	16
<i>V. cholerae</i> El Tor <i>tcp</i> <sup>-</sup>	8	0
<i>V. cholerae</i> O139 <i>tcp</i> <sup>+</sup>	6	6
<i>V. cholerae</i> O139 <i>tcp</i> <sup>-</sup>	6	0
<i>E. coli</i>	2	0
<i>V. cholerae</i> не O1/не O139	4	0
<i>Aeromonas spp.</i>	4	0
<i>Salmonella spp.</i>	2	0



Рис. 2. Дот-ИФА исследуемых культур с ПХ-МКА H2F6:

Штаммы микроорганизмов: 1–13 – *V. cholerae* El Tor *tcp*<sup>+</sup>, 14–21 – *V. cholerae* El Tor *tcp*<sup>-</sup>, 22–26 – *V. cholerae cholerae tcp*<sup>+</sup>, 27–29 – *V. cholerae* не O1/не O139, 30 – *E. coli*, 31–34 – *Aeromonas spp.*, 35–40 – *V. cholerae* O139 *tcp*<sup>+</sup>, 41–43 – *V. cholerae* O139 *tcp*<sup>-</sup>

Конъюгаты ПХ-МКА H2F6 также исследовали в прямом дот-иммуоферментном анализе (рис. 2). Результаты дот-ИФА показали, что препараты взаимодействуют только с холерными вибрионами O1 и O139 серогрупп, имеющими ген *tcp*. Положительная реакция на нитроцеллюлозной мембране проявляется в виде четко окрашенных коричневых пятен-дотов. Отрицательная реакция (отсутствие окрашенных пятен или еле заметные пятна) зарегистрирована в отношении *tcp*<sup>-</sup> штаммов *V. cholerae* O1, O139, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов.

Результаты проведенной работы показывают, что из культуральной жидкости гибридомы H2F6, накопленной при пассировании *in vitro*, возможно выделить специфические моноклональные иммуноглобулины, на основе которых могут быть приготовлены пероксидазные конъюгаты с титром 1:64 для постановки прямого ТИФА и дот-ИФА. Экспериментальные серии препаратов разливали на аликвоты и хранили при -20 °С. Часть препаратов стабилизировали путем лиофильного высушивания, в качестве криопротектора добавляли 1 % БСА (Albumin bovine, Amresco). Результаты испытаний препаратов после хранения их в лиофилизированном состоянии в течение 12 месяцев показали, что они сохраняют специфическую активность на исходном уровне.

Таким образом, полученные моноклональные пероксидазные конъюгаты на основе МКА H2F6 имеют диагностическую значимость, т.к. способны выявлять в прямых методах ИФА *tcp*<sup>+</sup> штаммы *V. cholerae* O1, O139, в том числе и нетоксигенные. Как известно, наличие пилей адгезии у нетоксигенных штаммов холерных вибрионов создает потенциальную возможность адсорбции на них фага СТХφ, в результате чего может произойти формирование нового клона. Адгезируясь на клетках тонкого кишечника с помощью *tcp*-пилей, холерные вибрионы образуют микроколонии с филаментозным матриксом, который окружает бактериальные клетки и защищает их от антибактериальных компонентов [13]. В связи с этим штаммы *ctx*<sup>-</sup> *tcp*<sup>+</sup> могут обладать определенным патогенетическим

потенциалом и возможностью выжить в условиях кишечника хозяина.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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 дот-иммуноанализа. *Клин. лаб. диагн.* 2013; 3:26–9.
2. Алексеева Л.П., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Храмов М.В., Кругликов В.Д., Агафонова В.В., Фатеева О.Ф., Чеботарев Д.А., Керманов А.В. Сравнительная оценка методов дот-иммуноанализа и иммунохроматографии при выявлении холерных вибрионов O1 серогруппы. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2010; 6:88–93.
3. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.
4. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С. Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры. *Клин. лаб. диагн.* 2016; 5:303–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307.
5. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. Моноклональные антитела к термостабильным поверхностным антигенам холерных вибрионов O1- и O139-серогруппы. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2015; 3:51–7.
6. Кэтти Д., редактор. Антитела. Методы. Т. 1. М.: Мир; 1991. 384 с.
7. Кэтти Д., редактор. Антитела. Методы. Т. 2. М.: Мир; 1991. 382 с.
8. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 4:60–8.
9. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Прометной В.И., Монахова Е.В., Водопьянов С.О., Телесманич Н.Р., Дудина Н.А. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 ctxAB<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2007; 1:23–9.
10. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Тюленева Е.Г., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Водопьянов С.О. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006–2015 гг. Прогноз на 2016 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:20–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-20-27.
11. Chen W., Lu J.Zh.G., Yuan Z., Wu Q., Li J., Xu G., He A., Zheng Ji., Zhang Ju. Development of an immunochromatographic lateral flow device for rapid diagnosis of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa. *Clinical Biochemistry*. 2014; 47(6):448–54. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.12.022.
12. Jyoung J.Y., Hong S., Lee W., Choi J.W. Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance. *Siosens. Bioelectron*. 2006; 21(12):2315–9. DOI: 10.1016/j.bios.2005.10.015.
13. Krebs S.J., Taylor R.K. Protection and attachment of *Vibrio cholerae* mediated by the toxin-coregulated pilus in the infant mouse model. *J. Bacteriol.* 2011; 193(19):5260–70. DOI: 10.1128/JB.00378-11.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–5.
15. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem Cytochem*. 1974; 22:1084–91.
16. 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 Methods*. 2011; 87(2):224–33. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.07.022.
17. 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. *Biosen. Bioelectron*. 2013; 42:229–35. DOI: 10.1016/j.bios.2012.10.011.
18. Thattiyaphong A., Okada K., Khangrang S., Nispa W., Sawanpanyalert P., Honda T. Development of a 5-minute rapid test for detecting *Vibrio cholerae* O139. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 2013; 44(3):448–55.
19. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immu-

nobinding – Current status and outlook. *J. Immunol. Methods*. 1984; 72:313–40.

20. Tuteja U., Kumar S., Shukla J., Kingston J., Batra H.V. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56(Pt 10):1340–5. DOI: 10.1099/jmm.0.47166-0.

#### References

1. Alekseeva L.P., Kozlova G.A., Markina O.V., Kretenchuk O.F., Yagovkin M.E., Bursha O.S. [Usage of monoclonal peroxidase conjugates for identification of cholera vibrios O1, O139 in dot-immunoassay]. *Klin. Lab. Diagnost.* 2013; 3: 26–9.
2. Alekseeva L.P., Telesmanich N. R., Lomov Yu.M., Khranov M.V., Kruglikov V.D., Agafonova V.V., Fateeva O.F., Chebotarev D.A., Kermanov A.V. [Comparative evaluation of dot-immunoassay and immune-chromatographic methods in case of cholera vibrio O1 detection]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2010; 6: 88–93.
3. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. Leningrad: "Medgiz"; 1962: 180 p.
4. Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretenchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Bursha O.S. [Immune-enzyme analysis in cholera diagnostics]. *Klin. Lab. Diagnost.* 2016; 5:303–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307.
5. Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretenchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V. [Monoclonal antibodies to thermo-resistant surface antigens of cholera vibrio O1 and O139]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2015; 3:51–7.
6. Ketty D., editor. [Antibodies. Methods]. Vol. 1. M.: "Mir"; 1991. 384 p.
7. Ketty D., editor. [Antibodies. Methods]. Vol. 2. M.: "Mir"; 1991. 382 p.
8. Monakhova E.V. [Cholera vibrio virulence strategy and ways of its realization (Scientific review)]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:60–8.
9. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Podosinnikova L.S., Vodyanitskaya S.Yu., Prometnoy V.I., Monakhova E.V., Vodop'yanov S.O., Telesmanich N.R., Dudina N.A. [Cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 ctxAB<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2007; 1:23–9.
10. Titova S.V., Moskvitina E.A., Kruglikov V.D., Samorodova A.V., Tyuleneva E.G., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Arkhangel'skaya I.V., Ivanova S.M., Kovaleva T.V., Vodop'yanov S.O. [Cholera: analysis of epidemiological situation across the world and in Russia within a period of 2006–2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:20–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-20-27.
11. Chen W., Lu J.Zh.G., Yuan Z., Wu Q., Li J., Xu G., He A., Zheng Ji., Zhang Ju. Development of an immunochromatographic lateral flow device for rapid diagnosis of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa. *Clinical Biochemistry*. 2014; 47(6):448–54. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.12.022.
12. Jyoung J.Y., Hong S., Lee W., Choi J.W. Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance. *Siosens. Bioelectron*. 2006; 21(12):2315–9. DOI: 10.1016/j.bios.2005.10.015.
13. Krebs S.J., Taylor R.K. Protection and attachment of *Vibrio cholerae* mediated by the toxin-coregulated pilus in the infant mouse model. *J. Bacteriol.* 2011; 193(19):5260–70. DOI: 10.1128/JB.00378-11.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–5.
15. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem Cytochem*. 1974; 22:1084–91.
16. 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 Methods*. 2011; 87(2):224–33. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.07.022.
17. 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. *Biosen. Bioelectron*. 2013; 42:229–35. DOI: 10.1016/j.bios.2012.10.011.
18. Thattiyaphong A., Okada K., Khangrang S., Nispa W., Sawanpanyalert P., Honda T. Development of a 5-minute rapid test for detecting *Vibrio cholerae* O139. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 2013; 44(3):448–55.
19. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding – Current status and outlook. *J. Immunol. Methods*. 1984; 72:313–40.
20. Tuteja U., Kumar S., Shukla J., Kingston J., Batra H.V. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56(Pt 10):1340–5. DOI: 10.1099/jmm.0.47166-0.

#### Authors:

Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Zyuzina V.P., Kretenchuk O.F., Yagovkin M.E. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

#### Об авторах:

Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Зюзина В.П., Кретенчук О.Ф., Яговкин М.Э. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 11.08.17.