

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-77-85

УДК 616.932

В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, О.А. Якушева, Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, В.П. Зюзина,  
М.Э. Яговкин**ИЗУЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ ПАНЕЛИ МКА ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ АТИПИЧНЫХ ПО АГГЛЮТИНАБЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ***

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

**Цель работы** – изучение поверхностных антигенных детерминант атипичных по признаку агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae* R-варианта с помощью иммуноферментного анализа и панели моноклональных антител (МКА). **Материалы и методы.** Исследовано 60 штаммов *V. cholerae* R-варианта, выделенных из объектов окружающей среды на территориях бывшего СССР и субъектов Российской Федерации за 30-летний период (1988–2019 гг.), в реакции слайд-агглютинации с холерными диагностическими сыворотками, иммуноферментном анализе с использованием панели МКА к мембранным белкам и набора реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА». **Результаты и обсуждение.** Проведен анализ поверхностных структур атипичных по агглютинабельности штаммов *V. cholerae* R-варианта иммуноферментным методом, который показал, что среди исследуемых штаммов, идентифицированных при выделении как *V. cholerae* R-варианта, регистрируются отдельные штаммы с различным количеством О-антигена (диапазон оптической плотности от  $0,261 \pm 0,002$  до  $1,312 \pm 0,003$ ). Эпитопы специфического О-антигена обнаружены у части «консервативных» штаммов (30 %), агглютинирующихся только сывороткой RO, и у нескольких штаммов (20 %), которые не имеют гена *wbeT*, детерминирующего его синтез, и потерявших агглютинабельность со всеми диагностическими холерными сыворотками, в том числе и RO. Эпитопы белковой природы, узнаваемые комплементарными МКА, с различной частотой представлены в составе поверхностных антигенов R-вибрионов; снижение их представленности или отсутствие на поверхности клетки коррелирует с модификацией или утратой R-ЛПС и сопровождается отрицательной реакцией агглютинации.

**Ключевые слова:** холерный вибрион, R-вариант, агглютинабельность, моноклональное антитело, эпитоп, О-антиген, мембранный белок OmpT, OmpU, иммуноферментный анализ.

Корреспондирующий автор: Евдокимова Вероника Вячеславовна, e-mail: nika\_evd@mail.ru.

Для цитирования: Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Якушева О.А., Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Зюзина В.П., Яговкин М.Э. Изучение с помощью панели МКА поверхностных антигенных детерминант атипичных по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae*. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 1:77–85. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-77-85

Поступила 30.09.2021. Принята к публ. 12.10.2021.

V.V. Evdokimova, L.P. Alekseeva, O.A. Yakusheva, D.A. Levchenko, V.D. Kruglikov, V.P. Zyuzina,  
M.E. Yagovkin**Study of the Surface Antigenic Determinants of *Vibrio cholerae* Strains with Atypical Agglutinability Using the Panel of Monoclonal Antibodies**

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

**Abstract.** The aim of the work was to study surface antigenic determinants of *V. cholerae* R-variant strains using enzyme immunoassay and a panel of monoclonal antibodies (MAbs). **Materials and methods.** 60 strains of *V. cholerae* R-variant isolated from ambient environment objects in the territories of the former USSR and the constituent entities of the Russian Federation over a 30-year period (1988–2019) were investigated in the slide agglutination reaction with cholera diagnostic sera, enzyme immunoassay (ELISA) using the panel of MAbs specific to membrane proteins and a set of reagents “Monoclonal diagnostic immunoglobulins labeled with horseradish peroxidase, dry, for serological identification of *V. cholerae* O1 and O139 (*in vitro*) through ELISA and dot-ELISA”. **Results and discussion.** The analysis of the surface structures of *V. cholerae* R-variant strains with atypical agglutinability has been carried out applying enzyme immunoassay. It showed that individual strains with different amounts of O-antigen are registered among the studied strains identified at isolation as *V. cholerae* R-variant (the optical density range is from  $0.261 \pm 0.002$  to  $1.312 \pm 0.003$ ). Epitopes of specific O-antigen were found in some “conservative” strains (30 %) that are agglutinated only with RO serum, and in several strains (20 %) that do not have the *wbeT* gene that determines its synthesis, and lost agglutinability with all diagnostic cholera sera, including RO. The protein epitopes recognized by complementary MAbs are represented with varying frequency in the composition of surface antigens of R-vibrios; a decrease in their representation or absence on the cell surface correlates with the modification or loss of R-LPS and is accompanied by a negative agglutination reaction.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, R-variant, agglutinability, monoclonal antibody, epitope, O-antigen, outer membrane protein OmpT, OmpU, enzyme-linked immunosorbent assay.

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

Corresponding author: Veronika V. Evdokimova, e-mail: nika\_evd@mail.ru.

Citation: Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Yakusheva O.A., Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Zyuzina V.P., Yagovkin M.E. Study of the Surface Antigenic Determinants of *Vibrio cholerae* Strains with Atypical Agglutinability Using the Panel of Monoclonal Antibodies. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*, 2022; 1:77–85. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-77-85  
Received 30.09.2021. Accepted 12.10.2021.

Evdokimova V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>  
Alekseeva L.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9866-3579>  
Yakusheva O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8159-7547>  
Levchenko D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4676-0377>

Kruglikov V.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>  
Zyuzina V.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3100-0049>  
Yagovkin M.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8414-4965>

На сегодняшний день практические лаборатории имеют в своем распоряжении необходимый набор диагностических препаратов для идентификации возбудителя холеры. При этом расширение номенклатуры, совершенствование, улучшение качества, стандартизация диагностикумов по-прежнему остаются актуальной задачей. Существенную роль в разработке новых диагностических средств играет идентификация антигенов или их фрагментов, специфичных исключительно для *Vibrio cholerae*. Гибридная технология позволяет получать панели высокоаффинных моноклональных антител (МКА) к отдельным эпитопам (в отличие от поликлональных сывороток) диагностически значимых антигенов холерных вибрионов. В настоящее время в Росздравнадзоре зарегистрированы следующие диагностические тест-системы на основе МКА для экспресс-диагностики холеры: «Тест-полоска *V. cholerae* O1» (ГНЦ ПМБ, г. Оболенск) [1], «Иммуноглобулины моноклональные диагностические флуоресцирующие сухие для серологической идентификации *Vibrio cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом РИФ «ИГ – *V. cholerae* O1/O139 – РИФ» (Ростовский-на-Дону противочумный институт) [2], «Иммуноглобулины моноклональные диагностические сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом РА «ИГ – *V. cholerae* O1/O139 – РА» (Ростовский-на-Дону противочумный институт) [3], «Тест-полоска *V. cholerae tox+*» (ГНЦ ПМБ, г. Оболенск) [4], «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *V. cholerae* (ИФАХолХТ-М)» (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов) [5], которые могут быть использованы в практическом здравоохранении.

Несмотря на то, что различные варианты иммуноферментного метода не включены в схему лабораторной диагностики холеры, применение моноклональных пероксидазных конъюгатов в иммуноферментном анализе (ИФА) и дот-ИФА представляется перспективным в ходе мониторинга воды поверхностных водоемов для обнаружения представителей *V. cholerae* O1, O139, количественной оценки специфического O-антигена, серологической характеристики типичных и атипичных штаммов, поскольку из объектов окружающей среды наряду с типичными могут выделяться штаммы холерных вибрионов, атипичные по серологическим свойствам, в том числе со сниженной агглютинабельностью холерными диагностическими сыворотками [6–10]. Так, например, в 2006 г. выделение атипичных по антигенному составу штаммов отмечалось на территории десяти административных районов Российской

Федерации. Среди выделенных культур 28,6 % составляли культуры со сниженной агглютинабельностью, неопределяемым сероваром и RO-вариантами. А.А. Мошкина [11] при изучении свойств забайкальских штаммов холерных вибрионов O1 отмечает атипичные штаммы с неустойчивыми свойствами: при первичной изоляции культуры обладают агглютинабельностью до титра диагностической холерной сывороткой O1, а при последующих пересевах титр агглютинации резко снижается вплоть до отсутствия агглютинации, вследствие чего установлена серологическая принадлежность к холерным вибрионам nonO1/nonO139 серогруппы. Кроме того, может наблюдаться диссоциация культур и появление R-колоний. Атипичные по серологическим признакам культуры холерных вибрионов изучались с помощью моноклональных антител в различных серологических методах: МКА, направленные к эпитопам O-боковой цепи, узнавали сходные детерминанты у типичных и тех атипичных вибрионов, которые агглютинировались до 1/4 титра O-сывороткой и в низких титрах – RO-сывороткой [12].

В случае пребывания холерного вибриона в неблагоприятных условиях окружающей среды изменению подвергаются прежде всего боковые полисахаридные цепи липополисахарида (ЛПС), отвечающие за серологическую специфичность холерных вибрионов. В процессе перехода штаммов Oгава в Инаба боковые цепи частично или полностью редуцируются, в итоге наблюдается снижение или утрата агглютинабельности, либо ее наличие только с сывороткой Инаба/Инаба и RO, или переход в R-варианты. У холерных вибрионов S→R мутации сопровождаются утратой квиновозамина и перозамина (сахаров, характерных для S-форм холерного вибриона) и потерей O-специфичности [13]. При изучении серологической дивергенции возбудителя холеры с помощью панели моноклональных антител, специфичных к детерминантам наружной клеточной стенки *V. cholerae* O1, обнаружены различия между представителями сероваров Инаба и Oгава в отношении антигенов белковой природы, хотя ранее предполагалось, что сероконверсия холерного вибриона O1 серогруппы из Oгава в Инаба обусловлена главным образом модификацией ЛПС [14]. В лаборатории гибридом Ростовского-на-Дону противочумного института получена и охарактеризована панель МКА, направленных к детерминантам полисахаридной и белковой природы *V. cholerae* O1, O139. На базе лаборатории сконструированы на основе МКА пероксидазные конъюгаты, используемые в реакциях ИФА и дот-ИФА.

**Целью** исследования явилось изучение поверхностных антигенных детерминант атипичных по признаку агглютинабельности штаммов *V. cholerae* R-варианта с помощью иммуноферментного анализа и панели МКА.

### Материалы и методы

**Штаммы микроорганизмов.** В работе использовали 60 штаммов *V. cholerae* R-варианта, полученных из коллекции Музея живых культур института. Взвеси холерных вибрионов готовили в 0,9 % растворе хлорида натрия (рН 7,2±0,1) по стандартным образцам мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича (в настоящее время – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России) 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 минут.

**Реакция агглютинации.** Серологическую идентификацию холерных вибрионов проводили в реакции агглютинации (РА) с серогрупповой (O1), серовароспецифическими (Огава и Инаба) и RO диагностическими холерными сыворотками [МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры»].

**Подъем гибридом из жидкого азота.** При размораживании клеток гибридом криопробирку помещали на 1–2 минуты на водяную баню при 37 °С, добавляли 10-кратный объем теплой культуральной среды, аккуратно перемешивали и центрифугировали 10 минут при 1000 об/мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640 («БиолоТ», Россия), содержащей 15 % сыворотки плода коровы (HyClone, США), определяли жизнеспособность, концентрацию клеток в тесте с трипановым синим и вносили их в лунки культуральных панелей с заранее подготовленным фидерным слоем [15].

**Культивирование гибридом *in vitro*.** Культивирование гибридом проводили с использованием стерильных сред и стерильной культуральной посуды, применяли антибиотики, а все манипуляции с клетками проводили в ламинарном боксе (Lamsystems, Россия) с принудительной подачей стерильного воздуха. По мере роста и тиражирования гибридных клонов *in vitro* производили перенос части клеток в лунки больших объемов (с макрофагами), контролируя антителопродукцию с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА). Смену среды культивирования (половину объема) производили через каждые 2–3 суток. После восстановления криоконсервированных гибридных клонов их пересеивали в чашки Петри и культуральные флаконы емкостью 50–100 мл и культивировали при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Морфологию клеток оценивали под инвертированным микроскопом, антителообразующую способность и активность антител в культуральной среде – в ТИФА.

### Препараты моноклональных антител.

Источником МКА служили культуральные жидкости, накопленные при многократном пассировании *in vitro* гибридом-продуцентов H2F6, A5D8, G3F5, E5F5. Выделение иммуноглобулиновой фракции из культуральных жидкостей осуществляли преципитацией сульфатом аммония [16] с последующим диализом. В полученных препаратах определяли концентрацию белка методом Лоури, равную 2–5 мг/мл. Для выявления O1-антигена холерных вибрионов использовали экспериментальный набор реагентов «Имуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА» (ТУ и акт внедрения от 02.09.2016 № 1041/1-16-10).

**Имуноферментный анализ.** Постановку прямого и непрямого твердофазного иммуноферментного анализа в полистироловых планшетах осуществляли по общепринятой методике [16]. При постановке непрямого ТИФА использовали антимишинный пероксидазный конъюгат (HRP-Goat-Anti-Mouse, Invitrogen, США). 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). Результаты считали положительными, если значение D<sub>450</sub> исследуемого образца в 2 раза и более превосходило среднее значение D<sub>450</sub> отрицательных контролей.

### Статистическая обработка результатов.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft Office 2003). При анализе и обобщении результатов планшетного ТИФА использованы параметрические статистические методы: вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку средней арифметической (P<0,05).

### Результаты и обсуждение

Известно, что поверхностные структуры клетки играют ключевую роль в процессе адаптации холерных вибрионов к условиям окружающей среды, в результате чего появляются штаммы с измененной антигенной структурой, в том числе и неагглютинабельные. В связи с этим интерес представляло изучение антигенного состава атипичных по агглютинабельности штаммов холерных вибрионов. Всего в исследование взяли 60 штаммов, выделенных из объектов окружающей среды на территориях бывшего СССР и субъектов Российской Федерации за 30-летний период (1988–2019 гг.), которые ранее были идентифицированы как эпидемически неопасные (нетоксигенные) штаммы *V. cholerae* R-варианта. Все штаммы исследованы в реакции агглютинации с холерными диагностическими серогрупповыми и серовароспецифическими сыворотками (O1, O139,



Огава, Инаба и RO) и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с целью детекции участков кластера *wbe*-O1, генов *ctxA*, *tcpA* [17]. Применение такого чувствительного метода, как иммуноферментный анализ, является эффективным в диагностике глубоко измененных по антигенной структуре штаммов холерных вибрионов. Для ответа на вопрос, как часто в составе поверхностных структур R-вибрионов встречаются эпитопы, специфичные для S-вибрионов, мы использовали панель МКА, полученных к типичным холерным вибрионам O1-серогруппы. В ходе работы для оценки представленности специфических антигенных детерминант на поверхности атипичных по признаку агглютинабельности штаммов *V. cholerae* R-варианта сначала проводили детекцию O-полисахарида в ТИФА с помощью пероксидазного конъюгата МКА-O1. Результаты представлены в табл. 1. По признаку агглютинабельности исследуемые штаммы мы разделили на шесть групп.

Как видно, эпитопы O-антигена обнаружены у всех представленных групп штаммов, в том числе у штаммов, агглютинирующихся только RO-сывороткой (табл. 1, № п/п 5), и штаммов, не агглютинирующихся ни одной из диагностических сывороток (табл. 1, № п/п 6). Отсутствие гена *wbeT* и в то же время способность некоторых штаммов 5-й и 6-й группы взаимодействовать с МКА-O1 может указывать на то, что у S- и R-штаммов имеются общие детерминанты O-антигена (R-антигена), не кодирующиеся геном *wbeT*. Более того, показатели оптической плотности (ОП) ( $0,360 \pm 0,004 \div 0,465 \pm 0,010$ ) позволяют говорить о низкой частоте представленности эпитопов, выявляемых соответствующими им МКА, и регистрировать их наличие на поверхности R-вибрионов можно только с помощью высокочувствительного ТИФА. В 1-й, 3-й, 4-й группах большая часть штаммов вступала в реакцию с МКА-O1 (диапазон ОП:  $0,261 \pm 0,015 \div 1,312 \pm 0,012$ ), что сви-

Таблица 1 / Table 1

Серологическая активность штаммов *V. cholerae* R-варианта  
Serological activity of *V. cholerae* R-variant strains

№ п/п No.	Количество штаммов Number of strains	Агглютинабельность холерными сыворотками Agglutinability with cholera sera				Генетическая характеристика Genetic profile	Реакция в ТИФА с ПХ МКА-O1 (кол-во штаммов) Results in ELISA with HP MAб-O1 (number of strains)	Диапазон ОП Range of optical density	
		O1 O1	Огава Ogawa	Инаба Inaba	RO RO				
1	10	+	+	-	-	<i>ctxA tcpA wbeT<sup>-</sup></i>	«+» (1)	$0,261 \pm 0,015$	
						<i>ctxA tcpA wbeT<sup>+</sup></i>	«+» (7)	$(0,489 \pm 0,01) \div$ $(1,002 \pm 0,013)$	
						<i>ctxA<sup>+</sup> tcpA<sup>+</sup> wbeT<sup>+</sup></i>	«+» (2)	$(0,635 \pm 0,011) \div$ $(0,701 \pm 0,023)$	
2	3	+	-	+	-	<i>ctxA tcpA wbeT<sup>+</sup></i>	«+» (1)	$0,697 \pm 0,014$	
							«-» (2)	$(0,078 \pm 0,02) \div$ $(0,088 \pm 0,005)$	
3	4	+	+	+	-	<i>ctxA tcpA wbeT<sup>+</sup></i>	«+» (3)	$(0,351 \pm 0,03) \div$ $(1,312 \pm 0,012)$	
							«+» (1)	$0,716 \pm 0,005$	
4	5	+	-	-	-	<i>ctxA tcpA wbeT<sup>-</sup></i>	«+» (1)	$0,275 \pm 0,02$	
							<i>ctxA tcpA wbeT<sup>+</sup></i>	«+» (3)	$(0,334 \pm 0,005) \div$ $(1,008 \pm 0,004)$
							<i>ctxA tcpA<sup>+</sup> wbeT<sup>+</sup></i>	«+» (1)	$0,687 \pm 0,01$
5	22	-	-	-	+	<i>ctxA tcpA wbeT<sup>-</sup></i>	«+» (7)	$(0,329 \pm 0,01) \div$ $(0,841 \pm 0,022)$	
							«-» (15)	$(0,074 \pm 0,12) \div$ $(0,095 \pm 0,022)$	
6	14	-	-	-	-	<i>ctxA tcpA wbeT<sup>-</sup></i>	«+» (3)	$(0,360 \pm 0,004) \div$ $(0,465 \pm 0,01)$	
							«-» (3)	$(0,077 \pm 0,005) \div$ $(0,085 \pm 0,01)$	
							<i>ctxA tcpA wbeT<sup>+</sup></i>	«-» (8)	$(0,088 \pm 0,005) \div$ $(0,097 \pm 0,014)$
K+								$1,453 \pm 0,01$	
K-								$0,053 \pm 0,013$	

Примечание: в табл. 1 представлены средние значения оптических плотностей (ОП) и стандартное отклонение  $P < 0,05$ ; K+ (положительный контроль); K- (отрицательный контроль). ПХ – пероксидаза хрена.

Note: the table 1 shows the average values of optical densities and the standard deviation  $P < 0,05$ ; K+ (positive control); K- (negative control). PH – horseradish peroxidase.

Таблица 2 / Table 2

Специфическая активность препаратов МКА в непрямом ТИФА  
Specific activity of MAb preparations in indirect ELISA

МКА MAb	Титр, ОП Titer, OD					
	1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000
H2F6	1,420±0,02	1,174±0,01	1,181±0,01	1,100±0,004	1,026±0,025	0,901±0,003
A5D8	1,560±0,03	1,302±0,022	1,195±0,01	1,032±0,02	0,920±0,012	0,815±0,01
G3F5	1,597±0,012	1,415±0,015	1,221±0,023	1,097±0,015	1,050±0,015	0,846±0,02
E5F5	1,519±0,02	1,306±0,011	1,138±0,011	1,101±0,014	1,024±0,01	0,808±0,015
К+ (положительный контроль/positive control)						1,635±0,03
К- (отрицательный контроль/negative control)						0,047±0,01

Примечание: в табл. 2 представлены средние значения оптических плотностей (ОП) и стандартное отклонение P<0,05; К+ (положительный контроль); К- (отрицательный контроль); ОП – оптическая плотность.

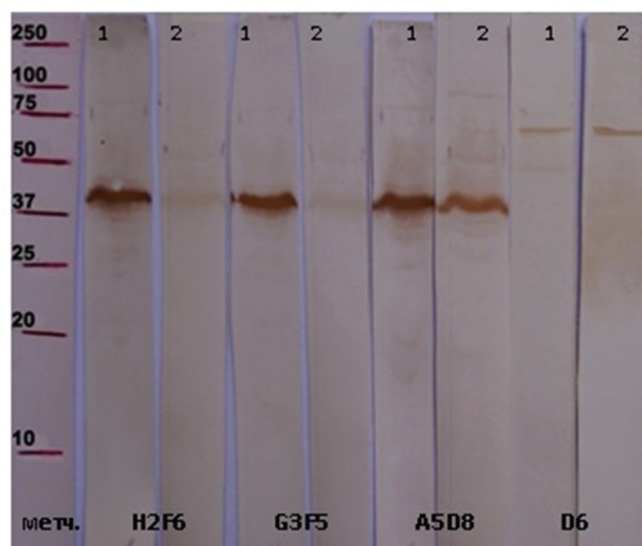
Note: the table 2 shows the average values of optical densities (OD) and the standard deviation P<0.05; К+ (positive control); К- (negative control); OD – optical density.

детельствовало, наряду с наличием гена *wbeT* и агглютинабельности холерными диагностическими серогрупповыми и сероварспецифическими сыворотками (O1, Огава, Инаба), об их принадлежности к O1-серогруппе. Во 2-й группе два из трех штаммов, агглютинирующихся сывороткой Инаба, не вступали в реакцию с МКА-O1, что обусловлено, скорее всего, утратой или частотой встречаемости концевых антигенных детерминант боковых цепей ЛПС, которые у штаммов Инаба более короткие, и чаще наблюдается их модификация при неблагоприятных воздействиях. Пятая группа, условно названная «консервативной» и обозначенная как R-вариант, включала штаммы, которые агглютинируются только сывороткой холерной RO от 1/2 диагностического титра и у которых отсутствует ген *wbeT*; в этой группе у 7 из 22 штаммов (30 %) обнаружены эпитопы O-антигена (диапазон ОП: 0,329±0,01 ÷ 0,841±0,022), судя по взаимодействию с МКА. Принимая во внимание положительную реакцию отдельных R-вариантов с МКА-O1, можно предположить, что геномная область биосинтеза O1-антигена сохраняется у этих «консервативных» R-штаммов, возможно, в измененной форме, что требует дальнейших молекулярно-генетических исследований. В 6-ю группу включены штаммы, которые потеряли способность агглютинироваться диагностическими холерными сыворотками, в том числе RO, несмотря на то, что часть из них содержит ген *wbeT*, но только с помощью МКА в ТИФА у 3 из 14 (20 %) штаммов обнаружены эпитопы O1-антигена.

Мы располагали панелью МКА, стабильно продуцирующих специфические иммуноглобулины к мембранным белкам холерных вибрионов O1-, O139-серогрупп [18]. Для приготовления препаративных количеств МКА клетки гибридом H2F6, A5D8, G3F5, E5F5 размораживали и тиражировали *in vitro*. Оценку интенсивности антителопродукции проводили с помощью тестирования в ТИФА образцов среды из лунок с гибридомами. После накопления культуральных жидкостей проводили выделение

иммуноглобулинов методом сульфатаммонийного осаждения (при 50 % насыщения). С помощью непрямого ТИФА установили специфическую активность каждого препарата МКА (табл. 2). В качестве антигена (сенситина) использовали обеззараженную бактериальную взвесь *V. cholerae* El Tor 18826 (*ctxA*<sup>+</sup>, *tcpA*<sup>+</sup>). Для работы препараты МКА использовали в рабочем разведении 1:4000 ÷ 1:8000.

Эпитопную направленность МКА определяли в иммуноблоттинге, используя лизаты клеток холерных вибрионов (рисунок). В результате обработки мембраны МКА H2F6 и G3F5 специфические белковые полосы обнаружены на уровне маркерных белков 38–42 кДа у штамма *V. cholerae* El Tor 18826 (*ctxA*<sup>+</sup> *tcpA*<sup>+</sup>), при инкубации мембраны



Иммуноблоттинг МКА H2F6, G3F5, E5F5, A5D8 с бактериальными лизатами:

1 – *V. cholerae* El Tor 18826 (*ctxA*<sup>+</sup> *tcpA*<sup>+</sup>); 2 – *V. cholerae* El Tor 18512 (*ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup>)

Immunoblotting of MAb H2F6, G3F5, E5F5, A5D8 with bacterial lysates:

1 – *V. cholerae* El Tor 18826 (*ctxA*<sup>+</sup> *tcpA*<sup>+</sup>); 2 – *V. cholerae* El Tor 18512 (*ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup>)

с МКА A5D8 – у штаммов *V. cholerae* El Tor 18826 (*ctxA<sup>+</sup> tcpA<sup>+</sup>*) и *V. cholerae* El Tor 18512 (*ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup>*), что подтверждает установленную ранее эпитопную направленность МКА: H2F6 и G3F5 специфичны к эпитопам белка наружной мембраны OmpT (40 кДа), A5D8 – OmpU (38 кДа) [18]. При обработке мембраны МКА D6 выявляются антигенные детерминанты, соответствующие белковой полосе с молекулярной массой 60–65 кДа.

Полученные препараты МКА использовали в непрямом ТИФА для изучения спектра мембранных белков у штаммов *V. cholerae* El Tor, *V. cholerae* O139, *V. cholerae* R-варианта. Результаты представлены в табл. 3.

Как видно, детерминанты мембранного белка OmpU, выявляемые МКА A5D8, представлены у всех исследуемых штаммов. По-видимому, этот мембранный порин является стабильным и консервативным антигеном, который остается неизменным даже при условии попадания холерных вибрионов в неблагоприятную среду и на этапе их перехода из S- в R-форму. Более того, может происходить увеличение биосинтеза белка OmpU, в частности у штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор при высокой температуре (42 °C), что является одним из механизмов их адаптации к действию теплового стресса [19]. МКА H2F6, G3F5 выявляют специфические эпитопы мембранного белка OmpT у *tcpA<sup>+</sup>* штаммов холерных вибрионов O1, O139, а среди R-вибрионов – как у *tcpA<sup>+</sup>*, так и у *tcpA<sup>-</sup>* штаммов (табл. 3, № п/п 6–9). МКА D6 обнаруживает «свои» эпитопы у всех взятых в исследование штаммов *V. cholerae* El Tor, O139, а среди штаммов *V. cholerae*

R-вариант – у большей части (82 %). Спектр поверхностных антигенных детерминант выборки штаммов представлен в табл. 4.

Анализ результатов ТИФА, полученных при исследовании 60 штаммов холерных вибрионов, отличающихся по признаку агглютинабельности, показал разнообразие представленности эпитопов на их поверхности. Так, все штаммы, агглютинирующиеся сыворотками O1 и серовароспецифической Огава и Инаба, вступали в реакцию с МКА O1, направленными к O-антигену, т.е. они равноценны поликлональной O1 сыворотке. Эти же штаммы взаимодействовали со всеми МКА, узнающими «свои» детерминанты в составе поверхностных белковых антигенов. Что касается штаммов, агглютинирующихся RO-сывороткой, то среди них лишь небольшая часть имела детерминанты мембранного белка OmpT (40 кДа), узнаваемые МКА H2F6, и единичные эпитопы O-антигена, подтверждение тому – низкие значения ОП в ИФА. Частота встречаемости эпитопов мембранных белков у штаммов, не агглютинирующихся ни одной из диагностических сывороток, была минимальной.

В неблагоприятных условиях среды обитания холерный вибрион использует несколько стратегий адаптации: формирование сложных сообществ микробных клеток – биопленок, переход в некультивируемое (покоящееся) состояние, трансформация в «персистирующий» фенотип [20–25]. Это приводит к появлению атипичных по фенотипическим признакам штаммов – от морфологии клеток и колоний до ослабления и утраты агглютинабельности холерными диагностическими серогрупповыми

Таблица 3 / Table 3

Взаимодействие штаммов *V. cholerae* El Tor, *V. cholerae* O139, *V. cholerae* R-варианта с МКА в ТИФАInteraction of *V. cholerae* El Tor, *V. cholerae* O139, *V. cholerae* R-variant strains with MAb in ELISA

№ п/п No.	Количество исследованных штаммов Number of strains	Бактериальные штаммы Bacterial strains	МКА (положительная реакция, количество штаммов) MAb (positive reaction; number of strains)			
			H2F6	A5D8	G3F5	D6
1	8	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA<sup>+</sup> tcpA<sup>+</sup></i>	8	8	7	8
2	8	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>+</sup></i>	8	8	7	8
3	8	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup></i>	0	8	0	8
4	5	<i>V. cholerae</i> O139 <i>ctxA<sup>+</sup> tcpA<sup>+</sup></i>	5	5	4	5
5	6	<i>V. cholerae</i> O139 <i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup></i>	0	6	1	6
6	3	<i>V. cholerae</i> R-вариант <i>ctxA<sup>+</sup> tcpA<sup>+</sup> wbeT<sup>+</sup></i> (вода/water)	3	3	2	3
7	1	<i>V. cholerae</i> R-вариант <i>ctxA<sup>+</sup> tcpA<sup>+</sup> wbeT<sup>+</sup></i> (человек/patient)	1	1	1	1
8	16	<i>V. cholerae</i> R-вариант <i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup> wbeT<sup>+</sup></i> (вода/water)	1	16	14	16
9	40	<i>V. cholerae</i> R-вариант <i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup> wbeT<sup>-</sup></i> (вода/water)	3	40	27	29

Таблица 4 / Table 4

Оценка методом ТИФА спектра поверхностных антигенных детерминант у атипичных по признаку агглютинабельности штаммов *V. cholerae* R-варианта

Evaluation of the spectrum of surface antigenic determinants in *V. cholerae* R-variant strains with atypical agglutinability using ELISA

№ п/п No.	Штамм <i>V. cholerae</i> R-варианта <i>V. cholerae</i> R-variant strains	Агглютинабельность холерными сыворотками Agglutinability with diagnostic cholera sera	Генетическая характеристика Genetic profile	F8G12 (МКА-O1) F8G12 (MAb-O1)	H2F6	A5D8	G3F5	D6
1	13918	O1(1/2 ДТ), Огава (1/2 ДТ) O1(1/2 DT), Ogawa (1/2 DT)	<i>ctxA<sup>+</sup> tcpA<sup>+</sup> wbeT<sup>+</sup></i>	+	+	+	+	+
2	17569	O1(ДТ) O1 (DT)	<i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>+</sup> wbeT<sup>+</sup></i>	+	+	+	+	+
3	17572	O1(1/4 ДТ), Инаба (ДТ) O1(1/4 DT) Inaba(DT)	<i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup> wbeT<sup>+</sup></i>	+	-	+	-	+
4	13910	RO (ДТ) RO (DT)	<i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup> wbeT<sup>-</sup></i>	-	+	+	-	+
5	16290	RO (ДРТ) RO (DWT)	<i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup> wbeT<sup>-</sup></i>	-	-	+	-	+
6	18138	RO (1/2ДТ) RO (1/2 DT)	<i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup> wbeT<sup>-</sup></i>	-	-	+	-	+
7	13902	отриц. negative	<i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup> wbeT<sup>-</sup></i>	-	-	+	-	+
8	18906	отриц. negative	<i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup> wbeT<sup>-</sup></i>	-	-	+	-	-
9	18500	отриц. negative	<i>ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup> wbeT<sup>-</sup></i>	-	-	+	-	-

Примечание: ДТ – диагностический титр сыворотки.

Note: DT – diagnostic titer of the serum.

(O1, O139) и вариантоспецифическими (Инаба и Огава) сыворотками – или агглютинирующихся RO-сывороткой в различных сочетаниях с ними. При идентификации атипичных по агглютинабельности холерных вибрионов O1, т.е. штаммов *V. cholerae* R-вариантов, следует учитывать, что они представляют собой форму антигенной изменчивости данных микроорганизмов. Основу внешней антигенной мозаики R-вариантов составляет R-ЛПС, и все воздействия, которым подвергается микробная клетка, в первую очередь отражаются на структуре R-core, обуславливая его значительные вариации по терминальным моносахаридам. Анализ с помощью панели МКА поверхностных структур атипичных по агглютинабельности штаммов *V. cholerae* R-варианта в иммуноферментном методе показал, что среди штаммов, идентифицированных при выделении как *V. cholerae* R-варианта, регистрируются отдельные культуры с различным количеством O-антигена (диапазон оптической плотности – от 0,261±0,002 до 1,312±0,003). Эпитопы специфического O-антигена обнаружены у небольшой части «консервативных» штаммов (30 %), агглютинирующихся только сывороткой RO, и у нескольких штаммов (20 %), которые не имеют гена *wbeT*, детерминирующего его синтез, и потерявших агглютинабельность со всеми

диагностическими холерными сыворотками, в том числе и RO, и такие варианты холерных вибрионов безусловно требуют дальнейшего изучения. Эпитопы мембранных белков 38–42 и 60–65 кДа, узнаваемые комплементарными МКА, с различной частотой представлены в составе поверхностных антигенов штаммов *V. cholerae*, взятых в исследование. Результаты ТИФА показали, что снижение их представленности или отсутствие на поверхности клетки коррелируют с модификацией или утратой R-ЛПС и сопровождаются отрицательной реакцией агглютинации. Вполне вероятно, что они находятся в ассоциации с R-ЛПС, образуя белково-полисахаридный комплекс. Для решения вопросов, касающихся антигенных отличий типичных и атипичных вибрионов, повышения точности и достоверности идентификации последних, представляется целесообразным углубленное изучение генов, детерминирующих синтез O- и R-ЛПС, их экспрессии и возможности обнаружения этих полисахаридов с помощью современных иммунологических методов на основе специфических поликлональных сывороток и МКА.

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



## Список литературы

- 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 до-иммуноанализа и иммунохроматографии при выявлении холерных вибрионов O1 серогруппы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010; 6:88–93.
- Кретенчук О.Ф., Алексеева Л.П., Маркина О.В., Козлова Г.А., Яговкин М.Э., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. Оптимизация условий получения диагностических флуоресцирующих моноклональных иммуноглобулинов для идентификации холерных вибрионов O1- и O139-серогрупп. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 12:32–4.
- Алексеева Л.П., Кругликов В.Д., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Евдокимова В.В., Авдеева Е.П., Фатеева О.Ф., Яговкин М.Э. Идентификация холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп с помощью моноклональных антител и реакции слайд-агглютинации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; 11:53–6.
- Баранова Е.В., Ветчинин С.С., Шевяков А.Г., Соловьев П.В., Миронова Л.В., Пономарева А.С., Басов Е.А., Хунхеева Ж.Ю., Кругликов В.Д., Алексеева Л.П., Бикетов С.Ф. Конструирование иммунохроматографического теста на основе моноклональных антител для выявления холерного токсина. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2020; 16(2):18–26.
- Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Осина Н.А., Щербаква С.А. Определение холерного токсина у штаммов *V. cholerae* в иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител. *Биозащита и биобезопасность*. 2014; 6(4):38–42.
- Хайтович А.Б. Биологические свойства *Vibrio cholerae* как составная часть эпиднадзора за холерой. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2001; 1:5–9.
- Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Куликалова Е.С., Шкаруба Т.Т. Роль и значение поверхностных водоемов в становлении и развитии VII пандемии холеры. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2009; 2:21–5.
- Иванова С.М., Титов Г.В., Безмертвый В.Е., Титова С.В., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Ежова М.И., Кудрякова Т.А., Зубкова Д.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды и от людей на территории Российской Федерации в 2014 году. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии. Вып. 28. Ростов н/Д; 2015. С. 67–70. [Электронный ресурс]. URL: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2015/06/Cholera-28-2015.pdf> (дата обращения 28.09.2021).
- Яшкулов К.Б., Каляева Т.Б., Оброткина Н.Ф., Тюнникова В.Д., Дандаева Б.В. О свойствах культур холерных вибрионов O1, выделенных из воды открытых водоемов Республики Калмыкия в период с 2012–2014 гг. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии. Вып. 28. Ростов н/Д; 2015. С. 71–5. [Электронный ресурс]. URL: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2015/06/Cholera-28-2015.pdf> (дата обращения 28.09.2021).
- Иванова С.М., Иванников В.В., Мискинова Т.А., Лопатин А.А., Титова С.В., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Левченко Д.А., Чемисова О.С., Гаевская Е.А., Ежова М.И., Непомнящая Н.Б. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2017 году. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник статей Проблемной комиссии. Вып. 31. Ростов н/Д; 2018. С. 48–51. [Электронный ресурс]. URL: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2019/01/СБОРНИК-31.pdf> (дата обращения 28.09.2021).
- Мошкина А.А. Свойства забайкальских штаммов холерных вибрионов O1, выделенных за последние пять лет. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник статей Проблемной комиссии. Вып. 32. Ростов н/Д; 2019. С. 110–112. [Электронный ресурс]. URL: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2019/11/Холера-и-патогенные-для-человека-вибрионы-выпуск-32.pdf> (дата обращения 28.09.2021).
- Алексеева Л.П., Черепихина И.Я., Сальникова О.И., Буракова О.С. Изучение антигенных взаимосвязей типичных и R-форм холерных вибрионов на основе моноклональных антител. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1998; 4:9–12.
- Hisatsune K., Hayashi M., Haishima Y., Kondo S. Relationship between structure and antigenicity of O1 *Vibrio cholerae* lipopolysaccharides. *J. Gen. Microbiol.* 1989; 135(7):1901–07. DOI: 10.1099/00221287-135-7-1901.
- Kaper J.B., Morris J.G. Jr, Levine M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1):48–86. DOI: 10.1128/CMR.8.1.48.
- Кэтти Д., редактор. Антитела. Методы. Кн. 1. М.: Мир; 1991. 287 с.
- Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высш. шк.; 1991. 288 с.
- Левченко Д.А., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Подойнищина О.А. Атипичность штаммов *Vibrio cholerae* O1 по признаку агглютинабельности. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(5):482–91. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-5-10.
- 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. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 3:51–7.
- Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Смирнова Н.И. Сравнительная устойчивость типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tox к действию неблагоприятных факторов внешней среды. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 2:11–7.
- Миронова Л.В. Современные представления о закономерностях эпидемического процесса при холере: экологические и молекулярно-биологические аспекты. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2018; 23(5):242–50. DOI: 10.18821/1560-9529-2018-23-5-242-250.
- Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Саппо С.Г., Миронова Л.В., Марков Е.Ю., Мальник В.В., Корзун В.М., Миткеева С.К., Балахонов С.В. Биопленка холерного вибриона: получение, характеристика и роль в резервации возбудителя в водной окружающей среде. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; 1:3–11.
- Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(2):e0004330. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004330.
- Jubair M., Morris J.G. Jr, Ali A. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel “persistor” phenotype. *PLoS One*. 2012; 7(9):e45187. DOI: 10.1371/journal.pone.0045187.
- Wu B., Liang W., Kan B. Growth phase, oxygen, temperature and starvation affect the development of viable but non-culturable state of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol.* 2016; 7:404. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00404.
- Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2013; 4:375. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375.

## References

- Alekseeva L.P., Telesmanich N.R., Lomov Yu.M., Khramov M.V., Kruglikov V.D., Agafonova V.V., Fateeva O.F., Chebotarev D.A., Kermanov A.V. [Comparative evaluation of dot-immunoassay and immunochromatography in the detection of *Vibrio cholerae* O1 serogroup]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2010; (6):88–93.
- Kretenchuk O.F., Alekseeva L.P., Markina O.V., Kozlova G.A., Yagovkin M.E., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V. [Optimization of conditions for obtaining diagnostic fluorescent monoclonal immunoglobulins for the identification of *Vibrio cholerae* O1- and O139-serogroups]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2012; 12:32–4.
- Alekseeva L.P., Kruglikov V.D., Telesmanich N.R., Lomov Yu.M., Evdokimova V.V., Avdeeva E.P., Fateeva O.F., Yagovkin M.E. [Identification of cholera vibrios of O1 and O139 serogroups using monoclonal antibodies and slide-agglutination reaction]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2010; (11):53–6.
- Baranova E.V., Vetchinin S.S., Shevyakov A.G., Solov'ev P.V., Mironova L.V., Ponomareva A.S., Basov E.A., Khunkheeva Zh.Yu., Kruglikov V.D., Alekseeva L.P., Biketov S.F. [Designing an immune-chromatographic test based on monoclonal antibodies to detect cholera toxin]. *Vestnik Biotechnologii i Fiziko-Himicheskoi Biologii Imeni Yu.A. Ovchinnikova [Bulletin of Biotechnology and Physical-Chemical Biology Named after Yu.A. Ovchinnikov]*. 2020; 16(2):18–26.
- Mikheeva E.A., Devdariani Z.L., Osina N.A., Shcherbakova S.A. [Detection of cholera toxin in *V. cholerae* strains in enzyme immunoassay using monoclonal antibodies]. *Biopazhachita i Biobezopasnost' [Biosecurity and Biosafety]*. 2014; 6(4):38–42.
- Khaitovich A.B. [Biological properties of *Vibrio cholerae* as an integral part of cholera surveillance]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2001; (1):5–9.
- Maramovich A.S., Urbanovich L.Ya., Kulikalova E.S., Shkaruba T.T. [The role and importance of surface water bodies in the emergence and development of the VII cholera pandemic]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2009; (2):21–5.



8. Ivanova S.M., Titov G.V., Bezsmertny V.E., Titova S.V., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., Arkhangel'skaya I.V., Ezhova M.I., Kudryakova T.A., Zubkova D.A., Vodopyanov S.O., Vodopyanov A.S. [Information on biological properties of cholera vibrios of O1 serogroup, isolated from environmental objects and from patients on the territory of the Russian Federation in 2014]. In: [Cholera and Pathogenic for Humans Vibrios. Proceedings of the Problem Commission]. Issue 28. Rostov-on-Don; 2015. P. 67–70. (Cited 28 Sept 2021). [Internet]. Available from: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2015/06/Cholera-28-2015.pdf>.
9. Yashkulov K.B., Kalyaeva T.B., Obrotkina N.F., Tyunnikova V.D., Dandaeva B.V. [Regarding the properties of cholera vibrio O1 cultures isolated from the water of surface reservoirs of the Republic of Kalmykia in 2012–2014]. In: [Cholera and Pathogenic for Humans Vibrios. Proceedings of the Problem Commission]. Issue 28. Rostov-on-Don; 2015. P. 71–5. (Cited 28 Sept 2021). [Internet]. Available from: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2015/06/Cholera-28-2015.pdf>.
10. Ivanova S.M., Ivannikov V.V., Miskina T.A., Lopatin A.A., Titova S.V., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., Arkhangel'skaya I.V., Levchenko D.A., Chemisova O.S., Gaevskaya N.E., Ezhova M.I., Nepomnyashchaya N.B. [Information about biological properties of cholera vibrios of O1 serogroup isolated from environmental objects on the territory of the Russian Federation in 2017]. In: [Cholera and Pathogenic for Humans Vibrios. Proceedings of the Problem Commission]. Issue 31. Rostov-on-Don; 2018. P. 48–51. (Cited 28 Sept 2021). [Internet]. Available from: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2019/01/СБОРНИК-31.pdf>.
11. Moshkina A.A. [Properties of Trans-Baikalian strains of cholera vibrios O1 isolated over the past five years]. In: [Cholera and Pathogenic for Humans Vibrios. Proceedings of the Problem Commission]. Issue 32. Rostov-on-Don; 2019. P. 110–2. (Cited 28 Sept 2021). [Internet]. Available from: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2019/11/Холера-и-патогенные-для-человека-вибрионы-выпуск-32.pdf>.
12. Alekseeva L.P., Cherepakhina I.Ya., Sal'nikova O.I., Burlakova O.S. [Study of antigenic relations between typical and R-forms of cholera vibrios, based on monoclonal antibodies]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1998; (4):9–12.
13. Hisatsune K., Hayashi M., Haishima Y., Kondo S. Relationship between structure and antigenicity of O1 *Vibrio cholerae* lipopolysaccharides. *J. Gen. Microbiol.* 1989; 135(7):1901–07. DOI: 10.1099/00221287-135-7-1901.
14. Kaper J.B., Morris J.G. Jr, Levine M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1):48–86. DOI: 10.1128/CMR.8.1.48.
15. Catty D., editor. [Antibodies. Methods]. Book 1. Moscow: "Mir"; 1991. 287 p.
16. Egorov A.M., Osipov A.P., Dzantiev B.B., Gavrilova E.M. [Theory and Practice of Enzyme Immunoassay]. Moscow: "High School"; 1991. 288 p.
17. Levchenko D.A., Arkhangel'skaya I.V., Kruglikov V.D., Podoinitsyna O.A. [Atypical strains of *Vibrio cholerae* O1 by agglutinability indicator]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2020; 97(5):482–91. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-5-10.
18. 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 cholerae* O1- and O139-serogroup]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2015; (3):51–7.
19. Zadnova S.P., Agafonov D.A., Shashkova A.V., Smirnova N.I. [Comparative resistance of typical and genetically altered strains of *Vibrio cholerae* El Tor biovar to adverse environmental factors]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2014; (2):11–7.
20. Mironova L.V. [Modern views on epidemic process patterns in case of cholera: ecological and molecular biological aspects]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and infectious diseases]*. 2018; 23(5):242–50. DOI: 10.18821/1560-9529-2018-23-5-242-250.
21. Kulikalova E.S., Urbanovich L.Ya., Sappo S.G., Mironova L.V., Markov E.Yu., Mal'nik V.V., Korzun V.M., Mitkeeva S.K., Balakhonov S.V. [*Vibrio cholerae* biofilm: production, characterization and role in pathogen preservation in the aquatic environment]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2015; (1):3–11.
22. Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(2):e0004330. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004330.
23. Jubair M., Morris J.G. Jr, Ali A. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel "persister" phenotype. *PLoS One.* 2012; 7(9):e45187. DOI: 10.1371/journal.pone.0045187.
24. Wu B., Liang W., Kan B. Growth phase, oxygen, temperature and starvation affect the development of viable but non-culturable state of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol.* 2016; 7:404. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00404.
25. Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2013; 4:375. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375.

#### Authors:

Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Yakusheva O.A., Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Zyuzina V.P., 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](mailto:plague@aaanet.ru).

#### Об авторах:

Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Якушева О.А., Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Зюзина В.П., 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](mailto:plague@aaanet.ru).