

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-84-89

УДК 616.932:616-07

Л.В. Ларионова, Р.В. Писанов, Д.И. Симакова, А.Н. Наркевич, И.В. Архангельская

ПОЛИМЕРНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЙ ДИАГНОСТИКУМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЕГО ПРОДУКЦИИ ВИБРИОНАМИ

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

Маркером эпидемической значимости холерных вибрионов является их токсигенность, поэтому большое внимание в настоящее время уделяется созданию диагностических препаратов для выявления холерного токсина и оценки уровня его продукции. Иммуносуспензионная реакция агломерации объемная, проводимая с помощью латексных диагностикумов, является аналогом реакции непрямой гемагглютинации, доступным и простым в техническом отношении методом, так как не требует наличия специального оборудования и может быть использована при проведении исследований в полевых условиях. **Целью** исследования являлось конструирование полимерного иммуноглобулинового диагностикума для определения холерного токсина и уровня его продукции штаммами вибрионов. **Материалы и методы.** Холерный токсин получали из штамма-продуцента *Vibrio cholerae Classical 569 B*. Кроличью сыворотку к токсину получали по подобранной авторами методике. Полимерный диагностический иммуноглобулиновый антитоксический препарат получали путем сенсибилизации иммуноглобулинов из противохолерной антитоксической кроличьей сыворотки на поверхности полиакролеиновых микросфер размером $(1 \pm 0,1)$ мкм. **Результаты и обсуждение.** Аналитическая чувствительность разработанного диагностического препарата с контрольным холерным токсином составляет 100 нг/мл. Он выявляет холерный токсин у токсигенных штаммов холерного вибриона в титре 1:16 – 1:512, дает отрицательную реакцию с нетоксигенными штаммами *V. cholerae* O1, *V. cholerae* nonO1/nonO139, с образцами гетерологичных культур, препаратами ЛПС, жидкой питательной средой, используемой для культивирования *V. cholerae*. Таким образом, сконструирован полимерный иммуноглобулиновый диагностикум для выявления и количественной оценки продукции штаммами вибрионов холерного токсина, установлена его аналитическая чувствительность и специфичность.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холерный токсин, иммуноглобулин, полимерные микросферы, диагностикум, аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность.

Корреспондирующий автор: Ларионова Людмила Владимировна, e-mail: plague@aaanet.ru.

Для цитирования: Ларионова Л.В., Писанов Р.В., Симакова Д.И., Наркевич А.Н., Архангельская И.В. Полимерный иммуноглобулиновый диагностикум для определения холерного токсина и оценки уровня его продукции вибрионами. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:84–89. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-84-89

Поступила 14.05.2020. Отправлена на доработку 02.03.2021. Принята к публ. 26.03.2021.

L.V. Larionova, R.V. Pisanov, D.I. Simakova, A.N. Narkevich, I.V. Arkhangel'skaya

Polimeric Immunoglobulin Diagnosticum for Detection of Cholera Toxin and Assessing the Level of Its Production by Vibrios

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

Abstract. A marker of the epidemic significance of *Vibrio cholerae* is their toxigenicity. Therefore, much attention is currently paid to the creation of diagnostic preparations for the detection of cholera toxin and assessment of the level of its production. The volumetric immunosuspension agglomeration reaction, carried out with the help of latex diagnosticums, is an analogue of the indirect hemagglutination reaction, an affordable and technically simple method, since it does not require special equipment and can be used when conducting research in the field. **The aim** of the study was to design a polymeric immunoglobulin diagnosticum for determining cholera toxin and the level of its production by vibrio strains. **Materials and methods.** Cholera toxin was obtained from the producer strain *Vibrio cholerae Classical 569 B*. Rabbit serum to the toxin was obtained according to the method selected by the authors. A polymeric diagnostic immunoglobulin antitoxic drug was obtained through sensitizing immunoglobulins from cholera antitoxic rabbit serum on the surface of polyacrolein microspheres with a size of (1 ± 0.1) μm . **Results and discussion.** The analytical sensitivity of the developed diagnostic preparation with control cholera toxin is 100 ng/ml. It detects cholera toxin in toxigenic strains of *Vibrio cholerae* in a titer of 1:16 – 1:512, gives negative results with non-toxigenic strains of *V. cholerae* O1, *V. cholerae* nonO1/nonO139, with samples of heterologous cultures, LPS preparations, liquid nutrient medium used for the cultivation of *V. cholerae*. Thus, a polymeric immunoglobulin diagnosticum has been constructed to detect and quantify the production of cholera toxin by vibrio strains, and its analytical sensitivity and specificity have been established.

Key words: *Vibrio cholerae*, cholera toxin, immunoglobulin, polymeric microspheres, diagnosticum, analytical sensitivity, analytical specificity.

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

Corresponding author: Lydmila V. Larionova, e-mail: plague@aaanet.ru.

Citation: Larionova L.V., Pisanov R.V., Simakova D.I., Narkevich A.N., Arkhangel'skaya I.V. Polimeric Immunoglobulin Diagnosticum for Detection of Cholera Toxin and Assessing the Level of Its Production by Vibrios. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:84–89. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-84-89

Received 14.05.2020. Revised 02.03.2021. Accepted 26.03.2021.

Larionova L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4645-4334>
Pisanov R.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>
Simakova D.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5598-5271>

Маркером эпидемической значимости холерного вибриона, независимо от принадлежности к O1 или O139 серогруппе, является его токсигенность, поэтому большое внимание в настоящее время уделяется созданию диагностических препаратов для выявления холерного токсина.

На сегодняшний день для выявления холерного токсина применяют различные методы: иммуноферментный анализ, спектроскопический анализ, метод масс-спектрометрии, выявление холерного токсина в культуре клеток, иммунофлуоресцентный метод с использованием ганглиозид-GM1-содержащей DASS-системы, реакцию коагутинации, латекс-агглютинацию с антиХТ-сывороткой; методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования определяется наличие генов, кодирующих синтез холерного токсина, однако не определяется продукция холерного токсина. Для этих целей может быть использован анализ уровня мРНК с помощью количественной или цифровой ПЦР. Также разработан иммуносенсор, основанный на комбинированном использовании GM1-липосом и антител к холерным токсинам (ХТ) в проточной системе с регистрацией сигнала специфической флуоресценции [1–10]. Для выявления генов, отвечающих за синтез холерного токсина, применяется полимеразная цепная реакция, требующая специальных тест-систем и реагентов. Для оценки токсинопродукции также используется выделение РНК с обратной транскрипцией [11–14].

В то же время существуют диагностические препараты для определения биологических агентов (антигенов или антител) на основе полимерных окрашенных носителей в простой и весьма экономичной реакции агломерации объемной, которая относится к экспресс-методам диагностики [15–17]. Такие тесты характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, простотой пробоподготовки, проведения анализа и учета результатов исследования.

Современные технологии позволяют получать синтетические носители определенных размеров с различными реакционно-способными группами на поверхности частиц, способными фиксировать антигены и антитела, что содействует получению стандартных и стабильных диагностических препаратов. Иммуносупензионная реакция агломерации объемная (РАО), проводимая при использовании латексных диагностикумов, по сути, является аналогом реакции непрямой геммагглютинации (РНГА), доступным и простым в техническом отношении методом, так как не требует наличия специального оборудования и может быть использована при проведении исследований в полевых условиях.

Цель исследования – конструирование полимерного иммуноглобулинового диагностикума для определения холерного токсина и уровня его продукции штаммами вибрионов.

Материалы и методы

Культивирование холерных вибрионов.

Штамм-продуцент холерного токсина (*Vibrio cholerae* Classical 569 В) культивировали на жидкой питательной среде АК1 с интенсивной аэрацией при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Получение холерного токсина. Культуральную жидкость центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость перенесли в чистую емкость и обеззараживали мертиолятом натрия до конечной концентрации 1:10000 с экспозицией 1 ч. К обеззараженной культуральной жидкости добавляли сульфат аммония до 50 % насыщения (рН 7,0). После центрифугирования раствора при 12 тыс. об/мин в течение 20 мин надосадочную жидкость сливали. Полученный осадок растворяли в 20 мМ фосфатном буферном растворе (рН 7,0) для ионообменной хроматографии. Хроматографическую очистку токсина проводили на FPLS Pathfinder-Duo Flow (Bio-Rad, США) на колонке UNO S12 повышающимся градиентом NaCl от 0 до 1 М. Токсин элюировался с колонки единственным пиком. После определения концентрации белка по методу Лоури полученный препарат разводили забуференным физиологическим раствором (ЗФР) и использовали для иммунизации.

Получение антитоксических сывороток. Для получения антитоксических сывороток использовали кроликов породы шиншилла весом 2,5–3,0 кг, которых иммунизировали по подобранной нами схеме. Все эксперименты с животными выполнялись в соответствии с законодательством Российской Федерации (приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23.08.2010 № 708н), Директивой Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Эксперименты осуществляли в соответствии с СП 1.3.3118-13.

Иммуноглобулины к холерному токсину из кроличьей сыворотки получали метаноловым методом. Для этого четыре части сыворотки разводили двумя частями ЗФР. Готовили метаноловую воду (6 мл метанола с 8 мл бидистиллированной воды). Стаканы для выделения иммуноглобулинов помещали на лед (0 °С), вносили в них сыворотку и хорошо перемешивали. Затем, покачивая стакан, постепенно вливали метаноловую воду и инкубировали при температуре минус 5 °С в течение 30–40 мин. После этого раствор центрифугировали (2 тыс. об/мин) в течение 20 мин при 0 °С. Осадок растворяли в половинном объеме ЗФР от исходного количества сыворотки. В полученном осадке определяли содержание белка по методу Лоури.

Полиакролеиновый микросферический носитель с альдегидными группами получали путем

синтеза акролеина в условиях одномоментно протекающей анионной и радикальной полимеризации в водно-щелочной среде. Окрашивание частиц сферической формы размером $(1,0 \pm 0,1)$ мкм производили внесением красителя тианин в процессе синтеза.

Далее полимерные микросферы сенсибилизировали антитоксическими иммуноглобулинами. Для этого 50 мг сфер отмывали 0,1 М боратным буфером (рН 8,4) и центрифугировали при 3 тыс. g при комнатной температуре в течение 15 мин. Осадок сфер суспендировали в 8 мл боратного буфера (рН 8,4), вносили 500 мкг белка иммуноглобулинов и инкубировали в течение 2 ч на электромагнитной мешалке, затем помещали в холодильник на 16–18 ч. После холодовой экспозиции к смеси добавляли 1 мл 1 % раствора желатозы, инкубировали в течение 2 ч на электромагнитной мешалке при комнатной температуре, отмывали трижды ЗФР. Полученный осадок суспендировали в 4 мл 0,1 % раствора желатозы. В результате проведенных исследований получен диагностикум полимерный холерный иммуноглобулиновый антитоксический *V. cholerae* O1 серогруппы с рабочим разведением 1:7.

Для повышения стабильности свойств и увеличения срока хранения разработанного диагностического препарата подобраны оптимальные условия его лиофилизации. Для этого жидкий диагностический препарат центрифугировали, осадок суспендировали в 3 % желатозо-сахарозной среде высушивания. Перед лиофилизацией проводили предварительное замораживание охлаждением в жидком азоте при температуре минус 196 °С в течение 1–2 мин. Затем флаконы с экспериментальным препаратом помещали в низкотемпературный шкаф (минус 45 ± 5 °С) для глубокого замораживания в течение 16 ч. Лيوфилизацию проводили в аппарате для лиофильного высушивания POWER-PL DRY-900 (Thermo Scientific) при вакуумном подогреве в течение 15 ч.

В ходе подготовки к проведению реакции агломерации объемной проводили подготовку реагентов. Лيوфилизированную нормальную кроличью сыворотку (НКС) растворяли в 5 мл ЗФР, получая разведение 1:100. Лيوфилизированный диагностикум суспендировали в 3,5 мл ЗФР, получая разведение 1:7. Контрольный раствор холерного токсина имел концентрацию 1 мг/мл.

Для постановки РАО в каждую U-образную лунку 96-луночного планшета для иммунологических реакций вносили 50 мкл НКС в разведении 1:100. Затем в первую лунку каждого ряда вносили 50 мкл холерного токсина в концентрации 1 мг/мл, получая концентрацию белка 500 мкг/мл, и двукратно титровали до конца ряда. Диагностикум в рабочем разведении вносили в объеме 25 мкл в каждую лунку и оставляли при комнатной температуре. Для контроля спонтанной агглютинации в две лунки вносили 50 мкл НКС и 25 мкл рабочего разведения диагностикума. Учет результатов осуществляли че-

рез 2–2,5 ч. За положительный результат принимали цветной голубой агломерат, равномерно выстилающий все дно лунки, или агломерат, выстилающий дно лунки с четко очерченными краями. В отрицательных случаях и в контроле образовывалось компактное колечко или «точка» в центре лунки.

Подобным образом исследовали бульонные питательные среды после культивирования в них различных штаммов холерного вибриона на наличие холерного токсина. Для этого взвеси холерного вибриона в жидкой питательной среде центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 30 мин, клеточный дебрис автоклавировали (121 °С; 1,5 атм в течение часа) и удаляли, надосадочную жидкость обеззараживали мертиолятом натрия до конечной концентрации 1:10000 с экспозицией 1 ч и исследовали в РАО с холерным полимерным иммуноглобулиновым антитоксическим диагностикумом. В качестве положительного контроля для определения чувствительности диагностикума использовали холерный токсин, выделенный и очищенный по описанной ранее методике.

Результаты и обсуждение

Кроликов иммунизировали препаратом холерного токсина по следующей схеме:

- 1-я иммунизация: 50 мкг в 0,5 мл ЗФР (рН 7,1) вводили в краевую вену уха и 50 мкг белка в 0,5 мл ЗФР + 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда подкожно в холку;

- 2-я иммунизация: через 14 дней 100 мкг белка в 0,5 мл ЗФР + 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда подкожно в холку;

- 3-я иммунизация: через 14 дней 50 мкг в 0,5 мл ЗФР вводили в краевую вену уха и 50 мкг белка в 0,5 мл ЗФР + 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда подкожно в холку.

Через 14 дней проводили пробный забор крови для определения титра антитоксических антител и затем забор крови для получения антитоксической сыворотки.

Титр антитоксических антител определяли методом GM1-ИФА [9]. Титр антитоксических антител составил 1:16000.

Полимерный диагностический иммуноглобулиновый антитоксический препарат получали путем сенсибилизации иммуноглобулинов из противохолерной антитоксической кроличьей сыворотки на поверхности полиакролеиновых микросфер размером $(1 \pm 0,1)$ мкм в дозе 1,0 мг белка на 100 мг полимерного носителя. Аналитическую чувствительность разработанного диагностикума исследовали в РАО по описанной методике. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) – минимальное количество антигена в образце, которое можно измерить с помощью анализа. Для этого препарат холерного токсина в дозе 1 мг белка/мл двукратно титровали в лунках полистиролового планшета для

Определение чувствительности и специфичности холерного полимерного иммуноглобулинового антитоксического диагностикума
Determination of the sensitivity and specificity of cholera polymeric immunoglobulin antitoxic diagnosticum

Наименование культуры Name of culture	Серогруппа Serogroup	Генетическая характеристика Genetic characterization	Титр холерного токсина в РАО Cholera toxin titer in VAR
<i>V. cholerae</i> Classical 1088 (569 B) Inaba	O1	ctxA+, tcpA+	1:64
<i>V. cholerae</i> Classical 1310	O1	ctxA+, tcpA+	1:32
<i>V. cholerae</i> Classical 698	O1	ctxA+, tcpA+	1:64
<i>V. cholerae</i> El Tor 12214 (M-878) Ogawa	O1	ctxA+, tcpA+	1:512
<i>V. cholerae</i> El Tor 5879	O1	ctxA+, tcpA+	1:256
<i>V. cholerae</i> 16064	O139	ctxA+, tcpA+	1:32
<i>V. cholerae</i> 16065	O139	ctxA+, tcpA+	1:16
<i>V. cholerae</i> 16068	O139	ctxA+, tcpA+	1:64
<i>V. cholerae</i> 16076	O139	ctxA+, tcpA+	1:32
<i>V. cholerae</i> 16131	O139	ctxA+, tcpA+	1:16
<i>V. cholerae</i> 17259	O139	ctxA+, tcpA+	1:32
<i>V. cholerae</i> El Tor 17751	O1	ctxA-, tcpA+	отрицательно / none
<i>V. cholerae</i> El Tor 18963 (preCTX)	O1	ctxA-, tcpA+	отрицательно / none
<i>V. cholerae</i> El Tor 14863	O1	ctxA-, tcpA-	отрицательно / none
<i>Escherichia coli</i>	-	-	отрицательно / none
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	отрицательно / none
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	отрицательно / none
ЛПС <i>V. cholerae</i> El Tor LPS <i>V. cholerae</i> El Tor	-	-	отрицательно / none
Жидкая питательная среда Liquid culture medium	-	-	отрицательно / none

иммунологических реакций, начиная с 500 мкг белка в первом разведении. Последнее разведение препарата, в котором фиксировали положительную реакцию, соответствовало 100 нг белка. Таким образом, аналитическая чувствительность диагностикума полимерного иммуноглобулинового антитоксического составляет 100 нг/мл.

При изучении специфичности разработанного диагностикума в РАО использовали бульонные питательные среды после культивирования различных штаммов *V. cholerae*. Аналитическая специфичность характеризует способность диагностического препарата определять специфический антиген *V. cholerae*. Для определения аналитической специфичности использованы обеззараженные мертиолятом натрия (1:10000) культуральные жидкости токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, гетерологичные культуры *Escherichia coli* (коммерческий, нетоксигенный штамм), *Klebsiella pneumonia* и *Enterococcus faecalis*. При проведении РАО исследуемые образцы не требовали предварительного разведения. Отрицательным контролем служили препараты холерного липополисахарида и жидкая питательная среда. РАО ставили по общеизвестной методике. Результаты реакции учитывали через 2 ч (таблица).

Результаты исследования токсигенности штаммов *V. cholerae* в РАО показали, что разработанный диагностический препарат выявляет холерный токсин у токсигенных штаммов в титре 1:16 – 1:512,

дает отрицательную реакцию с нетоксигенными штаммами и ЛПС *V. cholerae*, образцами гетерологичных культур и жидкой питательной средой.

Исследование контрольного препарата холерного токсина в реакции агломерации объемной показало, что чувствительность разработанного диагностического препарата составляет 100 нг/мл.

Используя полученные данные аналитической чувствительности диагностикума и титров токсина в РАО, возможно проведение количественной оценки токсинопродукции холерного вибриона [18, 19].

Для этого можно предложить следующую формулу:

$$K = P \cdot C,$$

где K – искомая концентрация холерного токсина; P – последнее разведение исследуемой жидкости, в котором фиксировался положительный результат; C – чувствительность диагностикума, нг/мл.

Например, токсинопродукция *V. cholerae* Classical 1088 (569 B) Инаба составит:

$$K = P \cdot C; 64 \cdot 100 = 6,4 \text{ мкг/мл.}$$

В результате проведенных исследований сконструирован полимерный иммуноглобулиновый антитоксический диагностический препарат, позволяющий определять холерный токсин и оценивать уровень его продукции *V. cholerae* в качественном и количественном выражении в простой одностадийной реакции агломерации объемной с визуальным учетом результатов через 2 ч. Аналитическая чувствитель-

ность диагностикума – 100 нг белка/мл. Полученный диагностикум специфичен: выявляет холерный токсин у токсигенных штаммов *V. cholerae* – титр в РАО составляет 1:16 – 1:512, при этом с нетоксигенными штаммами *V. cholerae* и гетерологичными культурами реакция отрицательная.

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

Список литературы

1. WHO – Global Task Force on Cholera Control Target Product Profile (TPP) for the development of improved Cholera rapid diagnostic tests. June 2017. [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/cholera/task_force/cholera-rapid-diagnostic-test.pdf (дата обращения 20.03.2020).
2. ВОЗ. Стандарты эпиднадзора за управляемыми инфекциями. Холера. Сентябрь 2018. [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/docs/default-source/immunization/vpd_surveillance/vpd-surveillance-standards-publication/02-who-surveillancevaccinepreventable-02-cholera-russian-r1.pdf?sfvrsn=a110ae17_10 (дата обращения 20.03.2020).
3. Sanchez J., Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell Mol. Life Sci.* 2008; 65(9):1347–60. DOI: 10.1007/s00018-008-7496-5.
4. Sanchez J., Holmgren J. Cholera toxin – a foe & a friend. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133(2):153–63.
5. Смирнова Н.И., Агафонова Н.А., Щелканова Е.Ю., Рыбальченко Д.А., Крицкий А.А., Альхова Ж.В., Краснов Я.М., Агафонова Е.Ю., Кутырев В.В. Структурные и функциональные изменения генома авирулентных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Tor ctxA+, tcpA+. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2020; 38(3):108–19. DOI: 10.17116/molgen202038031108.
6. Ho J.A., Wu L.C., Huang M.R., Lin Y.J., Baeumner A.J., Durst R.A. Application of ganglioside-sensitized liposomes in flow injection immunoanalytical system for the determination of cholera toxin. *Anal. Chem.* 2007; 79(1):246–50. DOI: 10.1021/ac060889n.
7. Tuteja U., Kumar S., Shukla J., Kingston J., Batra H.V. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxicogenic *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.
8. Терешкина Н.Е., Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Адамов А.К., Григорьева Г.В. Иммунодиагностика холеры: современное состояние проблемы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2010; 1(103):18–23.
9. Горяев А.А., Щелканова Е.Ю., Лозовский Ю.В., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Конструирование штамма *Vibrio cholerae* биовара эльтор гиперпродукента холерного токсина II типа и определение оптимальных условий для продукции этого белка. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2008; 1(95):56–9.
10. Германчук В.Г., Уткин Д.В., Спицин А.Н., Михеева Е.А., Осина Н.А. Применение методов спектроскопического анализа для выявления холерного токсина. *Здоровье населения и среда обитания.* 2016; 6:40–3.
11. Шашкова А.В., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Конструирование ПЦР тест-системы для идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, определения их биовара и дифференциации штаммов эльтор вибрионов на типичные и измененные. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2011; 4(110):49–52. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-49-52.
12. Полевая М.В., Чемисова О.С. Использование масс-спектрометрического анализа для детекции бактериальных токсинов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018; 1:93–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-1-93-101.
13. Гаева А.В., Громова О.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Волох О.А. Современные подходы к контролю активных компонентов холерной химической вакцины. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2018; 1:152–7.
14. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine.* 2020; 38 Suppl 1:A73-A82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.
15. Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Симакова Д.И. Роль малых РНК в контроле экспрессии генов, вовлеченных в реализацию патогенности *Vibrio cholerae*. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; 2:36–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-36-39.
16. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Агафонова В.В., Терентьев А.Н., Карбышев Г.Л. Конструирование антилипазного иммуноглобулинового полимерного диагностикума для вы-

явления штаммов холерных вибрионов эльтор, обладающих гемолитической и липазной активностью. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2006; 1:57–60.

17. Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Люкшина Е.Ю., Наркевич А.Н., Архангельская И.В., Меньшикова Е.А. Применение полимерных антигенных диагностикумов для выявления противохолерных антител в сыворотках крови больных. *Заметки ученого.* 2016; 2:78–80.

18. Ларионова Л.В., Наркевич А.Н., Симакова Д.И., Кочеткова А.П., Лысова Л.К., Люкшина Е.Ю. Способ получения диагностикума для количественного определения лечебного рекомбинантного α -интерферона в сыворотке крови больных вирусными инфекциями. Патент РФ № 2605621, опублик. 27.12.2016. Бюл. № 36.

19. Симакова Д.И., Писанов Р.В., Ларионова Л.В., Наркевич А.Н. Способ получения диагностикума для определения токсина холерного вибриона, выделенного из объектов окружающей среды. Патент РФ № 2703282, опублик. 16.10.2019. Бюл. № 29.

References

1. WHO – Global Task Force on Cholera Control Target Product Profile (TPP) for the development of improved Cholera rapid diagnostic tests. June 2017. (Cited 20 Mar 2020). [Internet]. Available from: https://www.who.int/cholera/task_force/cholera-rapid-diagnostic-test.pdf.
2. WHO. Surveillance standards for vaccine-preventable diseases. Cholera. September 2018. (Cited 20 Mar 2020). [Internet]. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/immunization/vpd_surveillance/vpd-surveillance-standards-publication/02-who-surveillancevaccinepreventable-02-cholera-russian-r1.pdf?sfvrsn=a110ae17_10.
3. Sanchez J., Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell Mol. Life Sci.* 2008; 65(9):1347–60. DOI: 10.1007/s00018-008-7496-5.
4. Sanchez J., Holmgren J. Cholera toxin – a foe & a friend. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133(2):153–63.
5. Smirnova N.I., Agafonova N.A., Shchelkanova E.Yu., Rybalchenko D.A., Kritsky A.A., Alkhova Zh.V., Krasnov Ya.M., Agafonova E.Yu., Kutyrev V.V. [Structural and functional changes in the genome of avirulent El Tor biovar *Vibrio cholerae* ctxA+, tcpA+ strains]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2020; 38(3):108–19. DOI: 10.17116/molgen202038031108.
6. Ho J.A., Wu L.C., Huang M.R., Lin Y.J., Baeumner A.J., Durst R.A. Application of ganglioside-sensitized liposomes in flow injection immunoanalytical system for the determination of cholera toxin. *Anal. Chem.* 2007; 79(1):246–50. DOI: 10.1021/ac060889n.
7. Tuteja U., Kumar S., Shukla J., Kingston J., Batra H.V. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxicogenic *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.
8. Tereshkina N.E., Mikheeva E.A., Devdariani Z.L., Adamov A.K., Grigoryeva G.V. [Immunodiagnosics of cholera: current state of the problem]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2010; (1(103)):18–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-18-23.
9. Goryaev A.A., Shchelkanova E.Yu., Lozovsky Yu.V., Touchkov I.V., Smirnova N.I. [Construction of an El Tor biovariant *Vibrio cholerae* strain capable of type II cholera toxin hyperproduction and determining the optimal conditions for the production of this protein]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2008; (1(95)):56–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-1(95)-56-59.
10. Germanchuk V.G., Utkin D.V., Spitsin A.N., Mikheeva E.A., Osina N.A. [Application of spectroscopic analysis for detection of cholera toxin]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2016; 6:40–3.
11. Shashkova A.V., Goryaev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Y.M., Smirnova N.I., Kutyrev V.V. [Construction of the PCR test-system for the detection of *Vibrio cholerae* O1 toxigenic strains, for indication of their biovar and for differentiation between typical and altered El Tor vibrio strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2011; (4(110)):49–52. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-49-52.
12. Poleeva M.V., Chemisova O.S. [The use of mass spectrometric analysis for the detection of bacterial toxins]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2018; 1:93–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-1-93-101.
13. Gaeva A.V., Gromova O.V., Durakova O.S., Generalov S.V., Volokh O.A. [Modern approaches to the control of active components of the chemical cholera vaccine]. *Razrabotka i Registratsiya Lekarsvennykh Sredstv [Development and Registration of Medicines]*. 2018; 1:152–7.
14. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay

A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine*. 2020; 38 Suppl 1:A73-A82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.

15. Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Simakova D.I. [The role of small RNAs in controlling expression of genes involved in the implementation of *Vibrio cholerae* pathogenicity]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (2):36–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-36-39.

16. Telesmanich N.R., Lomov Yu.M., Agafonova V.V., Terentyev A.N., Karbyshev G.L. [Construction of anti-lipase immunoglobulin polymeric diagnosticum for the detection of *Vibrio cholerae* El Tor strains with hemolytic and lipase activity]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2006; 1:57–60.

17. Larionova L.V., Simakova D.I., Lyukshina E.Yu., Narkevich A.N., Arkhangel'skaya I.V., Menshikova E.A. [The use of polymeric antigenic diagnostic kits for the detection of cholera antibodies in the sera of patients]. *Zametki Uchenogo [Scientist's Notes]*. 2016; 2:78–80.

18. Larionova L.V., Narkevich A.N., Simakova D.I., Kochetkova A.P., Lysova L.K., Lyukshina E.Yu. [A method for production of a diagnosticum for the quantitative determination of

therapeutic recombinant α -interferon in the blood serum of patients with viral infections]. RF patent No. 2605621, publ. 27.12.2016. Bul. No. 36.

19. Simakova D.I., Pisanov R.V., Larionova L.V., Narkevich A.N. [A method for production of a diagnosticum for the determination of *Vibrio cholerae* toxin isolated from environmental objects]. RF patent No. 2703282, publ. 16.10.2019. Bul. No. 29.

Authors:

Larionova L.V., Pisanov R.V., Simakova D.I., Narkevich A.N., Arkhangel'skaya I.V. 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:

Ларионова Л.В., Писанов Р.В., Симакова Д.И., Наркевич А.Н., Архангельская И.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.