

## МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.843.1:612.017.4:57.086.13:57.083.3

doi: 10.17072/1994-9952-2022-4-300-308

### Условия и сроки хранения лиофилизированных поли- и моноклональных антитоксических пероксидазных конъюгатов

О. А. Якушева<sup>1</sup>, Л. П. Алексеева<sup>2</sup>, В. В. Евдокимова<sup>3</sup>, В. П. Зюзина<sup>4</sup>,  
М. Э. Яговкин<sup>5</sup>

<sup>1-5</sup>Ростовский-на-Дону противочумный институт, Ростов-на-Дону, Россия

Авторы, ответственные за переписку: Ольга Александровна Якушева, yakusheva\_oa@antiplague.ru и Вероника Вячеславовна Евдокимова, evdokimova\_vv@antiplague.ru

**Аннотация.** Подобраны оптимальные условия лиофилизации поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов, используемых в прямом варианте иммуноферментного анализа (ИФА), предназначенном для детекции холерного токсина у штаммов *Vibrio cholerae* O1, O139. К числу эффективных стабилизаторов, включенных в состав защитных сред, относятся 1%-ная сахароза, 1%-ный тиосульфат натрия, 0.5%-ный яичный альбумин или 0.5%-ный бычий сывороточный альбумин. Их использование увеличивает сроки хранения, повышает стабильность, способствует сохранению высокой чувствительности и специфичности поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов. Оценка серологической активности антитоксических конъюгатов в ИФА после лиофилизации в защитной среде со стабилизаторами показала, что она остается на исходном уровне. Результаты проверки лиофилизированных конъюгатов в процессе хранения позволяют говорить о возможности их применения в течение двух лет без изменения основных показателей.

**Ключевые слова:** холерный токсин, поликлональный и моноклональный пероксидазный конъюгат, иммуноферментный анализ, дот-ИФА, лиофилизация, защитная среда высушивания

**Для цитирования:** Условия и сроки хранения лиофилизированных поли- и моноклональных антитоксических пероксидазных конъюгатов / О. А. Якушева, Л. П. Алексеева, В. В. Евдокимова, В. П. Зюзина, М. Э. Яговкин // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2022. Вып. 4. С. 300–308. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-4-300-308>.

## MICROBIOLOGY

Original article

### Storage conditions and terms of lyophilized poly- and monoclonal antitoxic peroxidase conjugates

O. A. Yakusheva<sup>1</sup>, L. P. Alekseeva<sup>2</sup>, V. V. Evdokimova<sup>3</sup>, V. P. Zyuzina<sup>4</sup>,  
M. E. Yagovkin<sup>5</sup>

<sup>1-5</sup>Rostov-on-Don Anti-Plague Institute. Rostov-on-Don, Russia

Corresponding authors: Olga A. Yakusheva, yakusheva\_oa@antiplague.ru, and Veronika V. Evdokimova, Evdokimova\_vv@antiplague.ru

**Abstract.** The article discusses the selection of optimal conditions for the lyophilization of poly- and monoclonal peroxidase conjugates used in the direct version of the enzyme immunoassay intended for the cholera toxin detection in *Vibrio cholerae* O1, O139 strains. Effective stabilizers included in protective media comprise 1 % sucrose, 1 % sodium thiosulfate, 0.5 % egg albumin, or 0.5 % bovine serum albumin. Their use increases the shelf life, increases stability, and contributes to the preservation of high sensitivity and specificity of poly- and monoclonal peroxidase conjugates. Evaluation of the serological activity of antitoxic conjugates in ELISA after lyophilization in a protective medium with stabilizers showed that it remains at the initial level. The results of testing lyophilized conjugates during storage allow us to speak about the possibility of their use for two years without changing the main indicators.

**Keywords:** cholera toxin, polyclonal and monoclonal peroxidase conjugate, enzyme-linked immunosorbent assay, dot-ELISA, lyophilization, drying protective medium

**For citation:** Yakusheva O. A., Alekseeva L. P., Evdokimova V. V., Zyuzina V. P., Yagovkin M. E. [Storage conditions and terms of lyophilized poly- and monoclonal antitoxic peroxidase conjugates]. *Bulletin of the*

## Введение

Холера, острая диарейная болезнь, вызываемая токсигенными штаммами *Vibrio cholerae*, продолжает оставаться приоритетной проблемой мирового здравоохранения. В настоящее время существует более 200 различных серогрупп холерных вибрионов, однако только токсигенные штаммы O1 и O139 серогрупп способны вызывать эпидемии холеры [Safa, Nair, Kong, 2010].

На основании биологических свойств представителей O1 серогруппы делят на биотипы – классический и El Tor, которые различаются по типу продуцируемого токсина, а также по нуклеотидной последовательности генов *ctxB*, кодирующих его биосинтез, и были обозначены у классических вибрионов как *ctxAB1*, у вибрионов El Tor – *ctxAB3* [Kim et al., 2014].

В результате эволюционных преобразований клинических изолятов *V. cholerae* El Tor по всему миру появились геноварианты, которые содержат в опероне *ctxAB*, кодирующем биосинтез токсина, специфический для классического биовара ген субъединицы В (*ctxB1*). Были также обнаружены клоны одной из генетических особенностей, у которых было наличие в опероне *ctxAB* нового аллеля гена *ctxB* – *ctxB7* [Kerketta, Kar, Khuntia, 2019].

Холерный токсин (ХТ) является одним из основных факторов патогенности холерных вибрионов и определяет основные проявления холеры. Для выявления ХТ, как в РФ, так и за рубежом, используют генно-диагностические методы (амплификация, изотермическая амплификация и полногеномное секвенирование), которые относятся к косвенным методам и позволяют обнаружить у исследуемых штаммов генетическую детерминанту вирулентности – ген ХТ (*ctxAB*) [Lyon, 2001; Gubala, Proll, 2006; Koskela et al., 2009; Kim et al., 2015; Izumiya et al., 2019]. Применение генно-диагностических методов, несмотря на их высокую чувствительность и специфичность, имеет ряд ограничений, например, наличие генов, детерминирующих синтез ХТ, не всегда является показателем экспрессии самого токсина, кроме того, с помощью этих методов невозможно определить его количество и в какой форме он продуцируется. Этот показатель определяют с помощью высокочувствительных иммунохимических методов, в частности, иммуноферментного анализа (ИФА). В зарубежных публикациях отмечается, что ИФА-системы остаются наиболее используемыми и достоверными, при этом для обнаружения ХТ применяют различные варианты иммуноферментного анализа («сэндвич» вариант дот-ИФА, двойной «сэндвич»-ИФА) [Tuteja et al., 2007; Meza-Lucas et al., 2016; Bayat, Khabiri, Nemati, 2018].

В иммуноферментном анализе широко используют конъюгаты антител с пероксидазой хрена (ПХ), что обусловлено доступностью сырья для выделения этого фермента, относительной легкостью очистки и конъюгации, а также большим числом хромофорных и флюорохромных субстратов [Пирожков и др., 2010]. Однако данный фермент является чувствительным к ряду факторов, что приводит к потере его каталитической активности в процессе хранения и уменьшению способности антител связываться с соответствующим антигеном. Возможными причинами являются необратимое изменение конформации белковых молекул, модификация (например, окисление) функциональных групп белков, отвечающих за проявление каталитической активности или способности образовывать специфические иммунокомплексы, микробная контаминация и последующая деградация белков. Фермент имеет слабжесткую структуру и подвержен отрицательному влиянию внешних воздействий, в связи с чем срок его годности ограничен и составляет 6 месяцев, что обуславливает и низкий срок годности тест-системы в целом, в то время как срок годности остальных компонентов тест-системы в 2–3 раза выше [Пат. RU2232190C2 ..., 2004]. В связи с этим существует необходимость подбора условий и методов, повышающих срок годности иммунопероксидазных конъюгатов, и разработки подходов к возможной стабилизации биологической активности фермента [Куклина и др., 2011]. Эффективным методом, увеличивающим стабильность таких препаратов, является лиофилизация. Известно, что присутствие в средах высушивания таких компонентов, как сыворотка эмбриона теленка [Кытманов и др., 2018], гидролизат птичьего альбумина [Пат. RU216.013.4820 ..., 2015] в сочетании с 1%-ным поливинилпирролидоном и с 1%-ным тиосульфатом натрия [Загоскина и др., 2015], и/или 0.2 %-ным пропионатом кальция оказывает заметный стабилизирующий эффект. Введение сахарозы перед лиофилизацией конъюгатов предотвращает падение биологической активности пероксидазы и способствует образованию объемной таблетки при лиофилизации и хранении [Шаморова, 2009].

На базе ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора получены экспериментальные серии пероксидазных конъюгатов на основе поли- и моноклональных антитоксических антител [Якушева и др., 2020a]. Эти препараты позволяют выявлять ХТ у токсигенных холерных вибрионов O1, O139 серогрупп.

Цель работы – оценить в процессе хранения физико-химическую и специфическую активность лиофильно высушенных поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов, предназначенных для детекции ХТ в прямом варианте планшетного ИФА и дот-ИФА.

## Материалы и методы исследований

В работе использовали 25 штаммов холерных вибрионов и 6 штаммов гетерологичных микроорганизмов, полученных из коллекции Музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора (табл. 1). Штаммы *V. cholerae* O1 и O139 с различным генотипом были подобраны согласно их паспортным данным.

Культуры вибрионов хранили в столбике полужидкого (0.3±0.1%) агара Мартена при температуре 20±2°C, культуры гетерологичных микроорганизмов – в 0.3%-ном полужидком мясо-пептонном агаре с рН 7.1–7.2. Все исследуемые штаммы были типичными по морфологическим, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам.

Таблица 1

**Варианты генотипов штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, использованные в работе**  
**[Genotype variants of O1 and O139 serogroup *V. cholerae* strains used in this study]**

Штаммы	Генотип	Источник выделения	Год выделения	Место выделения
<i>Vibrio cholerae</i> O1 серогруппы классического биовара				
569B	<i>ctxAB1+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1950	Индия
500	<i>ctxAB1+</i> , <i>tcpA+</i>	-	1968	Пакистан
1763	<i>ctxAB1+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1947	Индокитай
<i>Vibrio cholerae</i> O1 серогруппы Эль Тор биовара				
1310	<i>ctxAB3+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1966	Ирак, г. Багдад
3119	<i>ctxAB3+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1970	г. Одесса
5879	<i>ctxAB3+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1972	г. Таганрог
12214	<i>ctxAB3+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1976	-
13020	<i>ctxAB3+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1986	г. Азов
14383	<i>ctxAB3+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1990	Ростовская обл. х. Колузаево
14455	<i>ctxAB3+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1990	г. Ставрополь
14460	<i>ctxAB3+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1990	г. Ставрополь
14464	<i>ctxAB3+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1990	г. Ставрополь
<i>Vibrio cholerae</i> O1 серогруппы Эль Тор биовара (геноварианты)				
17917	<i>ctxAB1+</i> , <i>tcpA+</i>	вода	1999	вода
19667	<i>ctxAB7+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	2014	г. Москва
<i>Vibrio cholerae</i> O139 серогруппы				
16070	<i>ctxAB+</i> , <i>tcpA+</i>	-	-	Индия
16063	<i>ctxAB+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1993	Ростовская обл. г. Азов
16064	<i>ctxAB+</i> , <i>tcpA+</i>	человек	1993	Ростовская обл. г. Азов
<i>Vibrio cholerae</i> O1 серогруппы Эль Тор биовара				
19766	<i>ctxAB-</i> , <i>tcpA-</i>	вода	2015	г. Элиста, пруд Заячий
19778	<i>ctxAB-</i> , <i>tcpA-</i>	вода	2015	Иркутская обл. р. Ангара
19791	<i>ctxAB-</i> , <i>tcpA-</i>	вода	2015	Краснодарский край, р. Агура
19813	<i>ctxAB-</i> , <i>tcpA-</i>	человек	1998	г. Мариуполь
19875	<i>ctxAB-</i> , <i>tcpA-</i>	вода	2015	г. Элиста, пруд Заячий
<i>Vibrio cholerae</i> O139 серогруппы				
17675	<i>ctxAB-</i> , <i>tcpA-</i>	вода	1997	г. Москва, р. Москва
17677	<i>ctxAB-</i> , <i>tcpA-</i>	вода	1997	г. Москва, р. Москва
17678	<i>ctxAB-</i> , <i>tcpA-</i>	вода	1997	г. Москва, р. Москва
Гетерологичные микроорганизмы				
<i>Escherichia coli</i> 1961	-	-	1965	-
<i>Escherichia coli</i> 1962	-	-	1965	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> P-143	вода	-	1944	г. Ростов-на-Дону, р. Дон
<i>Aeromonas hydrophila</i> P-1269	вода	-	1959	г. Санкт-Петербург, р. Нева
<i>Salmonella typhimurium</i> 1288	-	-	1960	г. Лондон
<i>Salmonella typhimurium</i> 4446	-	-	-	г. Лондон

В качестве источника токсина использовали супернатанты токсигенных штаммов. Исследования с применением патогенных биологических агентов II–III групп патогенности осуществляли согласно требованиям санитарных правил СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СП 1.3.2322-2008 «Безопасность работы с микроорганизмами III и IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

По отработанной схеме [Якушева и др., 2020б] были приготовлены экспериментальные образцы поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов для детекции ХТ в супернатантах токсигенных штаммов *V. cholerae* O1, O139 серогрупп. Конъюгаты на основе моноклональных антител имели рабочее раз-

ведение 1:32, а поликлональные – 1:64, при этом их чувствительность в прямом варианте ТИФА и дот-ИФА равнялась 10 нг/мл.

Подбор оптимального стабилизатора осуществляли путем оценки четырех вариантов среды высушивания:

первый вариант (I) – 1%-ная сахароза, 1%-ный поливинилпирролидон, 0.5%-ный яичный альбумин; второй (II) – 1%-ная сахароза, 1%-ный тиосульфат натрия, 0.5%-ный яичный альбумин; третий (III) – 1%-ная сахароза, 1%-ный поливинилпирролидон, 0.5%-ный бычий сывороточный альбумин (БСА); четвертый (IV) – 1%-ная сахароза, 1%-ный тиосульфат натрия, 0.5%-ный БСА. Компоненты стабилизатора растворяли в фосфатно-солевом буфере pH 7.2 комнатной температуры при постоянном перемешивании. Полученный раствор фильтровали через фильтры Millipore с размерами пор 0.45 мкм с последующим добавлением в него равного объема конъюгата.

Жидкие пероксидазные антитоксические конъюгаты в защитной среде высушивания разливали по флаконам по 1 мл объемом 5 мл с резиновыми пробками и замораживали. Лиофилизацию проводили на аппарате для сублимационного высушивания Heto PowerDry PL9000, Thermo Scientific (Дания), в течение 11 ч., плавно изменяя температуру сушки с –25 до +30°C. Аналогичным образом лиофилизировали поли- и моноклональные пероксидазные конъюгаты к ХТ без добавления стабилизаторов. По окончании лиофилизации флаконы закупоривали в среде атмосферного воздуха. Готовый препарат хранили при 4°C.

Физические свойства поли- и моноклональных конъюгатов (растворимость, цветность, прозрачность, потеря в массе при высушивании) и иммунохимические (специфическая активность, чувствительность) контролировали до и после лиофилизации. Сроки хранения лиофилизированных конъюгатов оценивали в долгосрочных испытаниях через 6, 12, 18, 24 мес. в условиях сухого защищенного от света месте при температуре 4°C. Количественное определение белка проводили методом сравнения поглощения белков при 260 и 280 нм на приборе Bio-Rad SmartSpec Plus.

В опытах использовали одни и те же заведомо отрицательные и положительные пробы, аликвоты которых хранились при температуре –20°C. Специфическую активность и чувствительность проверяли на супернатантах токсигенных, нетоксигенных холерных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов, которые получали в результате выращивания штаммов в среде АКІ по стандартному методу М. Iwanaga [Iwanaga, Куууаканонд, 1987]. Специфическую активность регидратированных конъюгатов определяли в прямом ТИФА и дот-ИФА.

Постановку дот-ИФА осуществляли на нитроцеллюлозной мембране (НЦМ) с диаметром пор 0.45 мкм (Bio-Rad) [Якушева и др., 2020a].

Прямой ТИФА проводили в 96-луночных панелях «Costar» (USA), лунки которых сенсibilизировали в течение 2 ч. при 37°C соответствующими супернатантами в разведении 1:2 в 0.01 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7.4. В качестве положительного контроля использовали препарат очищенного ХТ 50 нг/мл [Алексеева и др., 2019], а отрицательным контролем являлась среда АКІ. Неспецифическую сорбцию блокировали 1%-ным раствором БСА в течение 30 мин. при 37°C.

Для разведения конъюгата использовали 0.01 М ФСБ (pH 7.4) с добавлением 0.05%-ного Твин 20. Длительность инкубации токсинсодержащих образцов с конъюгатами не превышала 30 мин. После каждого этапа следовала процедура отмывания планшета ФСБ pH 7.4 от несвязавшихся компонентов реакции. Субстратом служили свежеприготовленные растворы ТМБ (3.3'.5.5'-тетраметилбензидин) и 0.03%-ной перекиси водорода в 50 мМ цитрат-фосфатном буфере (pH 5.0). Реакцию останавливали через 10 мин. добавлением в лунки 2 М раствора серной кислоты. Результаты ИФА регистрировали с помощью спектрофотометра «Bio Tek EL 800» (Bio Tek Instruments, США) при длине волны 450 нм (референс-волна 630 нм). Все исследования проводили не менее чем в трех повторностях. При анализе результатов были использованы параметрические статистические методы ( $p < 0.05$ ). [Ашмарин, Воробьев, 1962].

## Результаты и их обсуждение

Приготовленные нами ранее [Якушева и др., 2020] экспериментальные образцы поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов для детекции ХТ в супернатантах токсигенных штаммов *V. cholerae* O1, O139 находились в жидком состоянии и хранились при 4°C. В этом случае сроки их эффективного использования ограничивались одной неделей, при хранении при температуре –20°C – шестью мес. Лиофильное высушивание поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов без стабилизатора не обеспечивало увеличения сроков их хранения.

Поэтому следующим этапом нашей работы был подбор стабилизирующей среды для лиофильного высушивания поли- и моноклональных пероксидазных антитоксических конъюгатов, способствующей сохранению их физико-химических свойств и специфической активности. Испытанию подверглись четыре варианта стабилизирующей среды. Подбор вариантов защитных сред базировался на результатах предварительных исследований, свидетельствующих о возможности использования традиционных компонентов: сахарозы, тиосульфата натрия, поливинилпирролидона, яичного и бычьего сывороточного

альбумина, которые обеспечивают высокий уровень сохранности препаратов при различных режимах сушки. Как показали результаты ТИФА, рабочий титр и чувствительность моноклонального и поликлонального пероксидазного конъюгатов остались на исходном уровне после добавления к ним различных стабилизирующих сред. Согласно полученным данным, все вышеуказанные компоненты, входящие в состав сред, не препятствовали связыванию иммуноглобулинов с антигеном, а также обеспечивали возможность проникновения субстрата к активному центру пероксидазы.

Была проведена лиофилизация поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов к ХТ с использованием стабилизирующих сред и оценены их основные физико-химические и биологические показатели. Препараты после лиофилизации представляли собой гомогенную компактную массу в виде таблетки белого цвета, равномерно прилегающей к внутренней поверхности флакона, конъюгаты без стабилизатора имели серый оттенок. Остаточная влажность сухих конъюгатов не превышала 2%. После добавления необходимого объема растворителя (дистиллированная вода) лиофилизированные препараты хорошо без осадка растворялись в течение 1 мин. при температуре 20...25°C.

Регидратированные препараты представляли собой гомогенные, слабо опалесцирующие жидкости, от бесцветной до слабожелтой окраски, без хлопьев и комков. Результаты исследований показали снижение значений оптической плотности в прямом ТИФА для поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов, лиофилизированных без стабилизирующей среды. Аналогичную реакцию наблюдали и в отношении лиофилизатов первой и третьей стабилизирующих сред (табл. 2). В препаратах поли- и моноклональных конъюгатов, лиофилизированных без стабилизирующей среды, отмечено снижение содержания белка на 10.5±0.04 и 9.9±0.09% соответственно. Показатель потери белка конъюгатов после лиофилизации в первой и третьей стабилизирующих средах составил 5.5%. Минимальное снижение количества белка установлено в препаратах лиофилизатов второй и четвертой стабилизирующих сред. Последние, как показали результаты ИФА, в большей степени способствовали сохранности специфической активности препаратов, тогда как для первого и третьего вариантов сред было зарегистрировано её снижение.

Таблица 2

**Оценка специфической активности и содержание белка в пероксидазных конъюгатах до и после лиофильного высушивания**

[Assessment of specific activity and protein content of peroxidase conjugates before and after lyophilic drying]

	До лиофилизации			После лиофилизации		
	Стабилизирующая среда	Содержание белка, %	ОП в ТИФА с с/н <i>V. cholerae</i> O1 El Tor <i>ctxAB</i> <sup>+</sup>	Стабилизирующая среда	Потеря белка, % от общего содержания	ОП в ТИФА с с/н <i>V. cholerae</i> O1 El Tor <i>ctxAB</i> <sup>+</sup>
Поликлональный конъюгат	Отсутствует	8.4±0.12	1.543±0.02	Отсутствует	10.5±0.04	0.888±0.01
	I	9.5±0.08	1.545±0.02	I	5.5±0.04	1.268±0.05
	II	9.3±0.04	1.540±0.02	II	1.2±0.04	1.538±0.03
	III	9.4±0.08	1.544±0.02	III	5.4±0.04	1.248±0.04
	IV	9.3±0.20	1.539±0.02	IV	1.4±0.04	1.527±0.01
	Положительный контроль			Положительный контроль		
	Отрицательный контроль			Отрицательный контроль		
Моноклональный конъюгат	Отсутствует	9.2±0.08	1.202±0.02	Отсутствует	9.9±0.09	0.719±0.01
	I	10.4±0.37	1.291±0.04	I	5.1±0.04	1.113±0.05
	II	10.2±0.12	1.298±0.01	II	1.3±0.09	1.268±0.02
	III	10.4±0.16	1.203±0.03	III	5.5±0.01	1.097±0.03
	IV	10.3±0.08	1.297±0.02	IV	1.1±0.03	1.268±0.01
	Положительный контроль			Положительный контроль		
	Отрицательный контроль			Отрицательный контроль		

Примечание. Представлены средние значения оптических плотностей (ОП) и стандартное отклонение.

При использовании в ИФА лиофилизированных конъюгатов без стабилизатора показатели ОП были ниже. Результаты проверки активности и специфичности в ТИФА на широком наборе штаммов показали, что до лиофильного высушивания поли- и моноклональные конъюгаты специфично реагировали с супернатантами токсигенных штаммов *V. cholerae*, при этом показатели ОП для *V. cholerae* O1 Classical *ctxAB1*<sup>+</sup> и геновариантов, содержащих специфический для классического биовара ген (*ctxAB1*<sup>+</sup>) и ген (*ctxAB7*<sup>+</sup>), были 1.628±0.006 и 1.428±0.001 соответственно. Оптическая плотность лунок, сенсibilизированных супернатантами *V. cholerae* O1 El Tor, содержащих специфический для биовара El Tor ген *ctxAB3*<sup>+</sup> и *V. cholerae* O139 *ctxAB*<sup>+</sup> и инкубированных с поли- и моноклональными конъюгатами, находилась в пределах значений 0.585±0.003 и 0.412±0.007. Поли- и моноклональные конъюгаты не вступали в реакцию с супернатантами нетоксигенных штаммов и гетерологичными микроорганизмами, и тому подтверждение показатели ОП, равные 0.108±0.001 т.е. на уровне отрицательного контроля. Лيوфилизированные во второй и четвертой стабилизирующих средах поли- и моноклональные конъюгаты при взаи-

модействии с супернатантами *V. cholerae* O1 Classical *ctxABI*<sup>+</sup> и генетически измененными вариантами (*ctxABI*<sup>+</sup> и *ctxAB7*<sup>+</sup>) имели ОП 1.620±0.001 и 1.421±0.002, у *V. cholerae* O1 El Tor *ctxAB3*<sup>+</sup> и *V. cholerae* O139 *ctxAB*<sup>+</sup> ОП были 0.579±0.002 и 0.408±0.003. Эти значения сопоставимы с исходным уровнем активности препаратов. Положительная реакция также зарегистрирована в отношении поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов, лиофилизированных в первой и третьей стабилизирующих средах, однако при этом ОП значительно снизились. Так, для супернатантов штаммов *V. cholerae* O1 Classical *ctxABI*<sup>+</sup> и геновариантов (*ctxABI*<sup>+</sup> и (*ctxAB7*<sup>+</sup>) они находились в диапазоне 1.185±0.002 - 1.061±0.002. Для большей части супернатантов токсигенных штаммов ОП регистрировались в пределах 0.345±0.003 – 0.257±0.005, свидетельствуя о снижении активности конъюгатов после лиофилизации в первой и третьей стабилизирующих средах.

Экспериментальные образцы поли- и моноклональных конъюгатов до лиофильного высушивания и после него также были изучены в реакции дот-ИФА на широком наборе супернатантов штаммов *V. cholerae* O1. Их активность оценивали по интенсивности окрашивания пятен в местах нанесения токсинсодержащих образцов после выполнения дот-иммуноанализа.

Результаты сравнительной оценки лиофилизатов поли- и моноклональных конъюгатов показали, что все конъюгаты до лиофилизации обладают способностью связываться с супернатантами токсигенных штаммов *V. cholerae* O1, что подтверждается наличием сигнала только в местах нанесения токсинсодержащих образцов. Отсутствие окрашенных пятен на НЦМ у супернатантов штаммов *V. cholerae* O1, не содержащих в геноме детерминант ХТ и супернатантов гетерологичных микроорганизмов – показатель отрицательной реакции дот-ИФА и свидетельство строгой специфичности конъюгатов.

Таблица 3

**Определение специфической активности конъюгатов в ИФА после хранения в течение 6, 12, 18, 24 месяцев**

**[Determination of specific conjugate activity in ELISA after storage for 6, 12, 18, 24 months]**

	Стабилизирующая среда	Температура хранения	Титр лиофилизированных конъюгатов в ИФА до хранения	Титр лиофилизированных конъюгатов в ИФА			
				через 6 месяцев хранения	через 12 месяцев хранения	через 18 месяцев хранения	через 24 месяцев хранения
Поликлональный конъюгат	отсутствует	4°C	1:64	-	-	-	-
	I	4°C	1:64	1:64	1:32	1:16	1:8
	II	4°C	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64
	III	4°C	1:64	1:64	1:32	1:16	1:16
	IV	4°C	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64
Моноклональный конъюгат	отсутствует	4°C	1:32	-	-	-	-
	I	4°C	1:32	1:32	1:16	1:16	1:8
	II	4°C	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32
	III	4°C	1:32	1:32	1:16	1:16	1:8
	IV	4°C	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32

Примечание. - реакция отрицательная.

Взаимодействие супернатантов токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 с поли- и моноклональными конъюгатами, лиофилизированными во второй и четвертой стабилизирующих средах, сопровождалось появлением коричневых пятен на НЦМ. В то же время интенсивность реакции дот-ИФА снижалась, если супернатанты токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 вступали в реакцию с поли- и моноклональными конъюгатами, лиофилизированными в первой и третьей стабилизирующих средах, в которых наряду с сахарозой, БСА или яичным альбумином, присутствовал поливинилпирролидон, в отличие от второй и четвертой, содержащих тиосульфат натрия.

Аналогичные результаты с супернатантами токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 получены в реакции дот-ИФА при использовании поли- и моноклональных конъюгатов, лиофилизированных в среде без стабилизатора, и проявлялась она в виде менее окрашенных пятен. Необходимо также отметить отсутствие сигнала реакции у всех исследуемых лиофилизатов с супернатантами нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 и представителями гетерологичных микроорганизмов.

Представляя также практический интерес оценка стабильности лиофилизированных конъюгатов в процессе хранения в течение 6, 12, 18, 24 мес. при 4°C. Результаты в ИФА показали, что лиофилизированные конъюгаты сохраняли исходную специфическую активность при использовании второй и четвертой стабилизирующих сред (табл. 3). Показатели титров конъюгатов в этом случае оставались на исходном уровне. Хранение поли- и моноклональных конъюгатов, лиофилизированных в первой и третьей защитных средах, сопровождалось снижением рабочего титра до 1:8–1:16.

## Заключение

Таким образом, на основании данных, полученных в долгосрочных испытаниях, можно рекомендовать срок использования поли- и моноклональных конъюгатов в лиофилизированной форме в течение двух лет. Экспериментально доказано, что в течение этого периода времени серологические и физико-химические показатели лиофилизированных конъюгатов в защитной среде, содержащей 1% сахарозы, 1% тиосульфата натрия, 0.5% яичного альбумина или 0.5% БСА, остаются на уровне, соответствующем требованиям, предъявляемым к диагностическим препаратам.

## Список источников

1. Алексеева Л.П. и др. Современные методические приемы очистки холерного токсина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2019. Т. 15, № 1. С. 5–9.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962. 180 с.
3. Загоскина Т.Ю. и др. Совершенствование тест-системы для скрининга материала на ботулотоксин в дот-иммуноанализе // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАМН. 2015. Т. 101, № 1. С. 60–62.
4. Куклина Г.В. и др. Разработка иммуноферментной тест-системы для обнаружения *Legionella pneumophila* серогруппы 1 // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. Вып. 110. С. 61–64.
5. Кытманов А.А. и др. Разработка иммуноферментных моноклональных тест-систем для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза // Проблемы особо опасных инфекций. 2018. Вып. 3. С. 60–65. doi: 10.21055/0370-1069-2018-3-60-65.
6. Пат. RU2232190C2 Российская Федерация, МПК C12N9/08 C12N9/96 A61K39/00. Композиция для хранения водных растворов конъюгатов или антител с пероксидазой хрена / Н.А. Игнатова, А.П. Осипов; патентообладатель ЗАО Иммунотех. – заявл. 22.06.2001; опубл. 10.07.2004.
7. Пат. RU216.013.4820 Российская Федерация. Способ консервации иммунопероксидазного конъюгата / А.А. Зайцев, О.А. Гнусарева, С.А. Курчева и др.; патентообладатель Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. – № 0002549971; опубл. 10.05.2015.
8. Пирожков А.П. и др. Стабилизация пероксидазных конъюгатов, используемых в иммуноферментных тест-системах для выявления антигенов вирусов Эбола и Марбург // Вопросы вирусологии. 2010. № 1. С. 45–48.
9. Шаморова Н.А. Стабилизация конъюгата тироксин-пероксидаза аммониевой солью 8-анилинафтаил-1-сульфокислоты // Биотехнология. 2009. № 5. С. 90–93.
10. Якушева О.А. и др. Характеристика и оценка диагностической значимости поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов к холерному токсину // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2020а. Т. 16, № 2. С. 37–43.
11. Якушева О.А. и др. Оптимизация условий постановки прямого варианта дот-иммуноанализа для детекции холерного токсина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2020б. Т. 16, № 3. С. 25–31.
12. Bayat M., Khabiri A., Hemati B. Development of IgY-Based Sandwich ELISA as a Robust Tool for Rapid Detection and Discrimination of Toxigenic *Vibrio cholerae* // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 2018. doi: 10.1155/2018/4032531.
13. Gubala A.J., Proll D.F. Molecular-beacon multiplex real-time PCR assay for detection of *Vibrio cholerae* // Appl. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72, № 9. P. 6424–6428. doi: 10.1128/AEM.02597-05.
14. Iwanaga M., Kuyyakanond T. Large production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 in yeast extract peptone water // Journal of Clinical Microbiology. 1987. Vol. 25, № 1. P. 2314–2316.
15. Izumiya H. et al. Development of a loop mediated isothermal amplification assay for *Vibrio cholerae* O1 and O139 // Molecular and Cellular Probes. 2019. Vol. 45. P. 65–67. doi: 10.1016/j.mcp.2019.05.001.
16. Kerketta A.S., Kar S.K., Khuntia H.K. Detection of Haitian ctxB7 & tcpA alleles in *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Puri, Odisha, India // Indian J. Med. Res. 2019. Vol. 149, № 4. P. 558–560. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_1130\_17.
17. Kim E.J. et al. Molecular Insights Into the Evolutionary Pathway of *Vibrio cholerae* O1 Atypical El Tor Variants // PLoS Pathog. 2014. Vol. 10, № 9. doi: 10.1371/journal.ppat.1004384.
18. Kim E.J. et al. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of *Vibrio cholerae* O1 // Trends in Microbiology. 2015. Vol. 23, № 8. P. 479–489. doi: 10.1016/j.tim.2015.03.010.
19. Koskela K.A. et al. A multiplatform real-time polymerase chain reaction detection assay for *Vibrio cholerae* // Diagnostic microbiology and infectious disease. 2009. Vol. 65, № 3. P. 339–344.

20. Lyon W.J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67, № 10. P. 4685–4693. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.07.009.
21. Meza-Lucas A. et al. Comparison of DOT-ELISA and Standard-ELISA for Detection of the *Vibrio cholerae* Toxin in Culture Supernatants of Bacteria Isolated from Human and Environmental Samples // *Indian J. Microbiol.* 2016. Vol. 56, № 3. P. 379–382. doi: 10.1007/s12088-016-0596-2 .
22. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1 // *Trends Microbiol.* 2010. Vol. 18, № 1. P. 46–54. doi: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
23. Tuteja U. et al. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxicogenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA // *J. Med. Microbiol.* 2007. Vol. 56, № 10. P. 1340–1345. doi: 10.1099/jmm.0.47166-0.

## References

- Alekseeva L.P., Yakusheva O.A., Zyuzina V.P., Duvanova O.V., Shipko E.S., Pisanov R.V. [Modern methodological methods of cholera toxin purification]. *Vestnik bioteknologii i fiziko-chimicheskoj biologii im. Yu.A. Ovčinnikova.* V. 15, No 1 (2019): pp. 5-9. (In Russ.).
- Ashmarin I.P., Vorobiev A.A. *Statističeskie metody v mikrobiologičeskich issledovsnijach* [Statistical methods in microbiological research]. Leningrad, Medgiz Publ., 1962. 180 p. (In Russ.).
- Zagoskina T.Yu., Chaporgina E.A., Markov E.Yu., Popova Yu.O., Soloviev S.Yu., Andreevskaya N.M., Balakhonov S.V. [Improvement of the test system for screening material for botulinum toxin in dot-immunoassay]. *Bjulleten' Vostočno-Sibirskogo naučnogo centra Sibirskogo otdelenija RAMN.* V. 101, No 1 (2015): pp. 60-62. (In Russ.).
- Kuklina G.V., Fomenkov O.O., Elagin G.D., Kutaev D.A., Yanov D.S., Kytmanov A.A., Bogacheva N.V., Vorob'eva T.P., Darmov I.V., Pechenkin D.V. [Development of the Immuno-Enzyme Test-System for the Detection of *Legionella pneumophila*, Serogroup 1]. *Problemy osobo opasnyh infekcij.* Iss. 110 (2011): pp. 61-64. (In Russ.).
- Kytmanov A.A., Elagin G.D., Kuklina G.V., Pechenkin D.V., Fomenkov O.O., Eremkin A.V., Ipatov S.S., Ziganshin E.R. [Development of Immuno-Enzymatic Monoclonal Tests-Systems for the Detection of Glanders and Melioidosis Agents]. *Problemy osobo opasnyh infekcij.* Iss. 3 (2018): pp. 61-64. (In Russ.).
- Ignatova N.A., Osipov A.P. RF patent №. RU 2 232 190 C2, 2004.07.10. *Kompozicija dlja chranenija vodnyh rastvorov kon'jugatov ili antitel s peroksidazoj chrena* [Composition for storage of aqueous solutions of conjugates or antibodies with horseradish peroxidase]. (In Russ.).
- Zaitsev A.A., Gnusareva O.A., Kurcheva S.A., Garkusha Yu.Yu., Tyumentseva I.S., Rybalko T.I., Kulichenko A.N. RF patent №. RU 216.013.4820, 2015.05.10. *Sposob konservacii immunoperoxidaznogo kon'jugata* [Method of conservation of immunoperoxidase conjugate]. (In Russ.).
- Pirozhkov A.P., Borisevich I.V., Snetkova O.Yu., Androshchuk I.A., Syromyatnikova S.I., Khmelev A.L., Shatokhina I.V., Kudrin V.Yu., Timofeev M.A., Pantyukhov V.B., Borisevich S.V., Markov V.I., Bondarev V.P. [Stabilization of peroxidase conjugates used in enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antigens of the Ebola and Marburg viruses]. *Voprosy virusologii.* No 1 (2010): pp. 45-48. (In Russ.).
- Shamorova N.A. [Stabilization of the thyroxine-peroxidase conjugate with the ammonium salt of 8-anilinonaphthyl-1-sulfonic acid]. *Biotechnologija.* No 5 (2009): pp. 90-93. (In Russ.).
- Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Zyuzina V.P., Arkhangelskaya I.V., Yagovkin M.E. [Characterization and assessment of the diagnostic significance of poly and monoclonal peroxidase conjugates to cholera toxin]. *Vestnik bioteknologii i fiziko-chimicheskoj biologii im. Yu.A. Ovčinnikova.* V. 16, No 2 (2020a): pp. 37-43. (In Russ.).
- Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Arkhangelskaya I.V., Kruglikov V.D., Zyuzina V.P., Yagovkin M.E. [Optimization of conditions for setting a direct variant of dot-immunoassay for the detection of cholera toxin]. *Vestnik bioteknologii i fiziko-chimicheskoj biologii im. Yu.A. Ovčinnikova.* V. 16, No 3 (2020b): pp. 25-31. (In Russ.).
- Bayat M., Khabiri A., Hemati B. Development of IgY-Based Sandwich ELISA as a Robust Tool for Rapid Detection and Discrimination of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* (2018). doi: 10.1155/2018/4032531.
- Gubala A.J., Proll D.F. Molecular-beacon multiplex real-time PCR assay for detection of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 72, No 9 (2006): pp. 6424-6428. doi: 10.1128/AEM.02597-05.
- Iwanaga M., Kuyyakanond T. Large production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 in yeast extract peptone water. *Journal of Clinical Microbiology.* V. 25, No 1 (1987): pp. 2314-2316.
- Izumiya H., Morita M., Arakawa E., Ngo T.C., Nguyen H.T., Nguyen D.T., Ohnishi M. Development of a loop mediated isothermal amplification assay for *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Molecular and Cellular Probes.* V. 45 (2019): pp. 65-67. doi: 10.1016/j.mcp.2019.05.001.



16. Kerketta A.S., Kar S.K., Khuntia H.K. Detection of Haitian ctxB7 & tcpA alleles in *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Puri, Odisha, India. *Indian J. Med Res.* V. 149, No 4 (2019): pp. 558-560. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_1130\_17.
17. Kim E.J., Lee D., Moon S.H., Lee C.H., Kim S.J., Lee J.H., Kim J.O., Song M., Das B., Clemens J.D., Pape J.W., Nair G.B., Kim D.W. Molecular Insights Into the Evolutionary Pathway of *Vibrio cholerae* O1 Atypical El Tor Variants. *PLoS Pathog.* V. 10, No 9 (2014). doi: 10.1371/journal.ppat.1004384
18. Kim E.J., Lee C.H., Nair G.B., Kim D.W. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of *Vibrio cholerae* O1. *Trends in Microbiology.* V. 23, No 8 (2015): pp. 479-489. doi: 10.1016/j.tim.2015.03.010.
19. Koskela K.A., Matero P., Blatny J.M., Fykse E.M., Olsen J.S., Nuotio L.O., Nikkari S. A multiplatform real-time polymerase chain reaction detection assay for *Vibrio cholerae*. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* V. 65, No 3 (2009): pp. 339-344.
20. Lyon W.J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 67, No 10 (2001): pp. 4685-4693. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.07.009.
21. Meza-Lucas A., Pérez-Villagómez M., Martínez-López J., García-Rodea R., Martínez-Castelán M., Escobar-Gutiérrez A., de-la-Rosa-Arana J., Villanueva-Zamudio A. Comparison of DOT-ELISA and Standard-ELISA for Detection of the *Vibrio cholerae* Toxin in Culture Supernatants of Bacteria Isolated from Human and Environmental Samples. *Indian J. Microbiol.* V. 56, No 3 (2016): pp. 379-382. doi: 10.1007/s12088-016-0596-2.
22. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* V. 18, No 1 (2010): pp. 46-54. doi: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
23. Tuteja U., Kumar S., Shukla J., Kingston J., Batra H.V. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rec-tal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. *J. Med. Microbiol.* V. 56, No 10 (2007): pp. 1340-1345. doi: 10.1099/jmm.0.47166-0.

Статья поступила в редакцию 23.05.2022; одобрена после рецензирования 09.09.2022; принята к публикации 29.11.2022.

The article was submitted 23.05.2022; approved after reviewing 09.09.2022; accepted for publication 29.11.2022.

#### Информация об авторах

Ольга Александровна Якушева – yakusheva\_oa@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8159-7547>, науч. сотрудник;  
 Людмила Павловна Алексеева – lpalekseeva@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9866-3579>, доктор биол. наук, профессор;  
 Вероника Вячеславовна Евдокимова – evdokimova\_vv@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>, канд. биол. наук, науч. сотрудник;  
 Вера Павловна Зюзина – zyuzina\_vp@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3100-0049>, канд. биол. наук, старший науч. сотрудник;  
 Михаил Эдуардович Яговкин – yagovkin\_me@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8414-4965>, науч. сотрудник.

#### Information about the authors

Olga A. Yakusheva – yakusheva\_oa@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8159-7547>, research associate;  
 Lyudmila P. Alekseeva – lpalekseeva@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9866-3579>, doctor of biology, professor;  
 Veronika V. Evdokimova – evdokimova\_vv@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>, candidate of biology, researcher;  
 Vera P. Zyuzina – zyuzina\_vp@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3100-0049>, candidate of biology, senior researcher;  
 Mikhail E. Yagovkin – yagovkin\_me@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8414-4965>, research associate.

#### Вклад авторов:

Якушева О. А. – написание исходного текста; статистическая обработка материала.  
 Алексеева Л. П. – научное руководство; концепция исследования; итоговые выводы.  
 Евдокимова В. В. – анализ данных; доработка текста; итоговые выводы.  
 Зюзина В. П. – анализ литературы, ответственность за все аспекты работы, надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с достоверностью данных и целостностью всех частей статьи.  
 Яговкин М. Э. – анализ и интерпретация результатов работы, критический пересмотр содержания.

#### Contribution of the authors:

Yakusheva O. A. – writing the original text; statistical processing of the material.  
 Alekseeva L. P. - scientific management; conceptual studies; capture results.  
 Evdokimova V. V. – data analysis; text revision; survey results.  
 Zyuzina V. P. – analysis of the literature, responsibility for all aspects of the work, proper study and solution of issues characterized by the availability of data and the presence of all parts of the article.  
 Yagovkin M. E. – analysis and interpretation of the results of the work, revision of the content.