

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.843.1:612.017.4:57.083.3

doi: 10.17072/1994-9952-2022-4-280-287

Твердофазный иммуноферментный анализ (прямой вариант) для выявления токсигенных холерных вибрионов O1, O139 серогрупп

Л. П. Алексеева¹, О. А. Якушева², В. В. Евдокимова³, М. Э. Яговкин⁴,
В. П. Зюзина⁵

¹⁻⁵ Ростовский-на-Дону противочумный институт, г. Ростов-на-Дону, Россия

Авторы, ответственные за переписку: Ольга Александровна Якушева, yakusheva_oa@antiplague.ru и
Вероника Вячеславовна Евдокимова, Evdokimova_vv@antiplague.ru

Аннотация. В результате проведённых исследований оптимизирован метод прямого твёрдофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) для выявления токсигенных штаммов холерных вибрионов O1, O139 серогрупп на основе моноклональных и поликлональных антитоксических иммуноглобулиновых пероксидазных конъюгатов. Установлены оптимальные параметры его постановки: сенсibilизация планшета токсинсодержащими препаратами, разведёнными в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH 7.4 до титра 1:2–1:4, их адсорбция на твёрдой фазе планшета в течение 2 ч. при 37°C, блокировка свободных сайтов связывания 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) – 30 мин. (37°C), время контакта исследуемого образца с моно- или поликлональным пероксидазными конъюгатами – 30 мин. (37°C). Испытания на гомологичных и гетерологичных штаммах показали высокую специфичность иммуноферментного анализа и возможность его использования для обнаружения токсигенных холерных вибрионов.

Ключевые слова: холерный токсин, поликлональный и моноклональный пероксидазные конъюгаты, иммуноферментный анализ, лабораторная диагностика холеры

Для цитирования: Твердофазный иммуноферментный анализ (прямой вариант) для выявления токсигенных холерных вибрионов O1, O139 серогрупп / Л. П. Алексеева, О. А. Якушева, В. В. Евдокимова, М. Э. Яговкин, В. П. Зюзина // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2022. Вып. 4. С. 280–287. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-4-280-287>.

MICROBIOLOGY

Original article

Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (direct option) for detecting toxigenic vibrio cholerae serogroups O1 and O139

L. P. Alekseeva¹, O. A. Yakusheva², V. V. Evdokimova³, M. E. Yagovkin⁴,
V. P. Zyuzina⁵

¹⁻⁵Rostov-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. As a result of the studies, the method of direct solid-phase enzyme immunoassay (ELISA test) was optimized for detecting toxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups based on monoclonal and polyclonal antitoxic immunoglobulin peroxidase conjugates. The study detected the following optimal parameters for the analysis: sensitization of a tablet by toxicodermis drugs diluted in phosphate-saline buffer (PBS) pH 7.4, up to titers of 1:2-1:4, their adsorption on the solid phase of the tablet for 2 hours at 37° C, blocking of free binding sites by the 1% solution of bovine serum albumin (BSA) for 30 minutes (at 37°C); contact time of the investigated sample with mono- or polyclonal conjugates peroxidase - 30 minutes (at 37°C). Tests on homologous and heterologous strains showed a high specificity of the enzyme immunoassay and the possibility of its use for detecting toxigenic *Vibrio cholerae*.

Keywords: cholera toxin; polyclonal and monoclonal peroxidase conjugates; enzyme immunoassay; laboratory diagnosis of cholera

For citation: Alekseeva L. P., Yakusheva O. A., Evdokimova V. V., Yagovkin M. E., Zyuzina V. P. [Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (direct option) for detecting toxigenic vibrio cholerae serogroups O1 and O139]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 4 (2022): pp. 280-287. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-4-280-287>.

Введение

В настоящее время в лабораторной практике для оценки токсигенности холерных вибрионов O1, O139 серогрупп и эпидемической значимости выделенных штаммов широко используются молекулярно-генетические методы [Mehrabadi et al., 2012; Jin et al., 2013; Greig et al., 2018; Hossain et al., 2018]. Однако определение генов, кодирующих синтез холерного токсина (ХТ), не всегда указывает на наличие экспрессии самого токсина. Кроме того, в ряде ситуаций прямое выявление токсина остаётся предпочтительным, поскольку отмечен высокий уровень мутаций в локусе *ctx*, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам [Ahn-Yoon et al., 2003; Tuteja et al., 2007; Петрова и др., 2009; Алексеева и др., 2019; Bayat et al., 2019]. В связи с этим одновременно используются и иммунологические методы с высокой чувствительностью и специфичностью, так как штаммы холерных вибрионов Эль Тор и серогруппы O139 отличаются низким уровнем продукции токсина *in vitro* [Shlyapnikov et al., 2012; Meza-Lucas et al., 2016]. В последние годы отечественными специалистами зарегистрированы две тест-системы: иммунохроматографическая «Тест-полоска *Vibrio cholerae* tox⁺» [Баранова и др., 2020] и сэндвич-вариант «Тест-система ИФА для определения продукции ХТ штаммами *V. cholerae*» [Михеева и др., 2014.]. Однако некоторые параметры первой тест-системы, несмотря на экспрессность и простоту постановки, не в полной мере отвечают диагностическим требованиям по чувствительности, вторая отличается многостадийностью, многокомпонентностью, многократной отмывкой планшета, необходимостью приборного оснащения. В связи с этим остаётся актуальной проблема совершенствования и разработки новых, чувствительных и специфических диагностических средств, особенно предполагающих экспресс-тестирование. Нами в рамках плановой темы были разработаны иммуноглобулиновые пероксидазные конъюгаты на основе антитоксических моно- и поликлональных антител, которые можно использовать в прямом варианте твёрдофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) для определения продукции ХТ штаммами *V. cholerae* O1, O139 серогрупп, что позволяет предложить ТИФА в качестве дополнительного или альтернативного теста [Якушева и др., 2020].

Цель настоящей работы – оптимизация условий постановки прямого варианта твёрдофазного иммуноферментного анализа на полистироловых планшетах с помощью моно- и поликлональных пероксидазных конъюгатов, предназначенных для выявления токсигенных штаммов холерных вибрионов O1, O139 серогрупп.

Материалы и методы исследований

В работе использовали бактериальные штаммы из коллекции Музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (табл. 1).

В качестве источника токсина использовали супернатанты токсигенных штаммов. Разведения токсина и токсинсодержащих образцов готовили в буферных растворах – 0.01 М карбонат-бикарбонатном (КББ), рН 9.5; 0.01 М фосфатно-солевом (ФСБ), рН 7.4.

Положительным контролем служил препарат очищенного ХТ 0.05 мкг/мл [Алексеева и др., 2019], отрицательным – среда АК1.

Постановку ТИФА осуществляли следующим образом: в 96-луночные полистироловые планшеты последовательно вносили: исследуемый образец + моно- или поликлональный пероксидазный конъюгат + субстратная смесь + стоп-реагент [Егоров, 1991; Crowther, 2009]. Работу проводили, используя планшеты различных производителей: «Медполимер» (РФ), «Nunc» (Дания), «Costar» (USA). После каждого этапа следовала процедура отмывания планшета от несвязавшихся компонентов реакции.

Выявление холерного токсина в супернатантах (СН) токсигенных штаммов холерных вибрионов осуществляли с помощью моно- и поликлональных пероксидазных конъюгатов, полученных в ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора. Все штаммы выращены в среде АК1 по стандартному методу М. Iwanaga [Iwanaga, Куууаканонд, 1987]. Бактерии подращивали в колбы Эрленмейера (высота 150 мм; диаметр 15 мм) в среде АК1 в течение 4 ч. при 37°C. Культуру переносили в колбы Эрленмейера в дозе 2×10^7 м.к./мл, соблюдая соотношение один объем бульона АК1 на 10 объемов колбы. Последующее культивирование проводили при интенсивном встряхивании на термостатируемом шуттель-аппарате «Environmental Shaker-Incubator» ES-20/60 при 120 об./мин в течение 20 ч. при 37°C. Бактериальную массу обеззараживали мертиолятом натрия (1:10000), выдерживали 1 сут. в холодильнике, после чего делали трехкратные высевы на специфическую стерильность. Обеззараженные микробные

клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин. при 8000 об./мин. Экспериментальная работа проводилась с учетом требований 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».

Таблица 1

Штаммы холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, использованные в работе
[Strains of *V. cholerae* O1 and O139 serogroups used in this study]

Штаммы	Генотип	Источник выделения	Год выделения	Место выделения
<i>Vibrio cholerae</i> O1 серогруппы классического биовара				
569В	<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	н/д
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>	н/д	н/д	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		н/д	1965	н/д
<i>Escherichia coli</i> 1962		н/д	1965	н/д
<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		н/д	1960	г. Лондон
<i>Salmonella typhimurium</i> 4446		н/д	н/д	г. Лондон

Примечание: н/д – нет данных.

Оценивали эффективность 3-температурных режимов для адсорбции токсинсодержащих препаратов на твердой фазе полистироловых планшетов: 1) 2 ч. в термостате (37°C); 2) 2 ч. в термостате (37°C) и 18–20 ч. при температуре 4°C; 3) 18–20 ч. (4°C).

Процедуру блокирования свободной от иммунореагентов поверхности полистироловых планшетов проводили в течение 30 мин. (37°C) с применением в качестве блокирующего агента бычьего сывороточного альбумина в концентрациях 0,5, 1 и 2%; эмбриональной 5%-ной телячьей сыворотки; 1%-ного сухого обезжиренного молока.

Контакт ХТ с конъюгатами осуществляли в течение 30, 45, 60 мин. с целью определения оптимального времени инкубации.

Для разведения конъюгата использовали 0.01М ФСБ с добавлением 0.05%-ного Твин-20 (рН 7.4). Реакцию проявляли свежеприготовленным субстратным раствором ТМБ (3.3'.5.5'-тетраметилбензидин) в течение 25 мин., после её остановки 2 М серной кислотой измеряли значения оптической плотности. 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 статистические методы ($p < 0.05$). Все исследования осуществлялись в трех повторностях [Ашмарин, Воробьев, 1962].

Результаты и их обсуждение

Своевременная и достоверная характеристика свойств штаммов холерных вибрионов, выделенных от людей и из объектов окружающей среды, является важным моментом при определении тактики противоэпидемических мероприятий. Однако решающее значение приобретает получение информации о способности конкретных штаммов продуцировать холерный энтеротоксин и, следовательно, вызывать холерогенный синдром у чувствительного хозяина. В экспериментах использовали антитоксические моно- и поликлональные пероксидазные конъюгаты, предназначенные для детекции токсигенных штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогруппы в прямом варианте планшетного ИФА.

На первом этапе оптимизации условий постановки ТИФА были приняты во внимание сорбционные свойства твёрдой фазы, в качестве которой использовались 96-луночные планшеты для ИФА. С этой целью препараты очищенного ХТ титровали в планшетах различных производителей. Судя по показателям оптической плотности (ОП) в отношении ХТ, равном 1.505 ± 0.018 , максимальной сорбционной способностью обладали планшеты фирмы «Costar», тогда как планшеты фирм «Медполимер» и «Nunc» имели ОП 0.801 ± 0.002 и 1.207 ± 0.021 соответственно. В итоге установлено, что предпочтительнее использование планшетов фирмы «Costar». Планшеты других производителей обладали меньшей сорбционной способностью и однородностью сорбции. В связи с этим для работы выбраны планшеты «Costar», позволяющие достигать более высокой чувствительности и стандартности анализа.

Чувствительность, точность, воспроизводимость являются основными параметрами иммуоферментного анализа, которые могут существенно изменяться при вариации условий эксперимента (температура, ионная сила, pH реакционной среды, концентрационные соотношения компонентов и продолжительность их взаимодействия). Это определяет необходимость оптимизации каждой стадии анализа, для чего используют эмпирический подбор параметров в постановке ТИФА [Курчева и др., 2016].

Первоначально установили оптимальную сенсибилизирующую дозу токсинсодержащих образцов на твёрдой фазе планшета и буферный раствор для их разведения и адсорбции. Испытуемые препараты разводили в КББ pH 9.6 или ФСБ pH 7.4, начиная с 1:2, поскольку неразведённые супернатанты наряду с токсином содержат широкий спектр биологически активных веществ, что может приводить к ложноположительным результатам, особенно в реакции с антитоксической поликлональной сывороткой. Наличие ХТ в составе СН выявляли с помощью моно- и поликлональных пероксидазных конъюгатов в прямом варианте ТИФА. Продемонстрировано (рис. 1), что применение ФСБ для разведения испытуемых образцов более предпочтительно, так как обеспечивает эффективную адсорбцию токсина на поверхности полистироловых планшетов, и тому подтверждение высокие показатели ОП в реакции с моно- и поликлональными конъюгатами по сравнению с КББ.

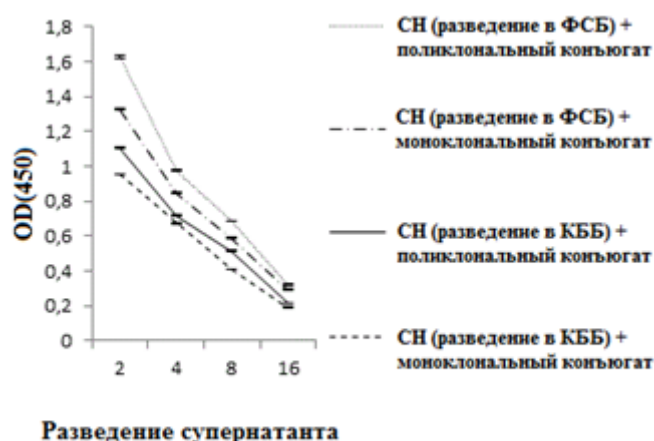


Рис. 1. Определение оптимальных разведений супернатанта штамма *V. cholerae* El Tor ctx+.

По горизонтали: обратное значение титра супернатанта штамма *V. cholerae* El Tor 19167; по вертикали: средние значения оптических плотностей в ТИФА

[Determination of optimal dilutions of *V. cholerae* El Tor ctx+ strain supernatant.

Horizontal: inverse titer value of the supernatant of *V. cholerae* El Tor 19167 strain; vertical: average optical densities in ELISA test]

Определение оптимального разведения супернатантов показало, что оно находится в пределах 1:2–1:4, поскольку именно в этом диапазоне регистрируются максимальные значения ОП.

Интенсивность иммуноферментной реакции также существенно зависит от времени экспозиции для адсорбции токсина в лунках планшета и температуры, при которой она осуществляется. В наших экспериментах были испытаны три различных режима, указанных в «Материалах и методах исследований».

Анализ полученных результатов (рис. 2) позволил установить, что оптимальным для сенсibilизации в лунках планшета токсинсодержащих образцов является режим 2 ч. и температура 37°C, в то время как при выдержке в течение 18–20 ч. в условиях холодильника и 2 ч. в термостате (37°C) адсорбционная способность несколько ниже. Менее эффективной является сенсibilизация СН, если она длится 18 ч. только при 4°C.

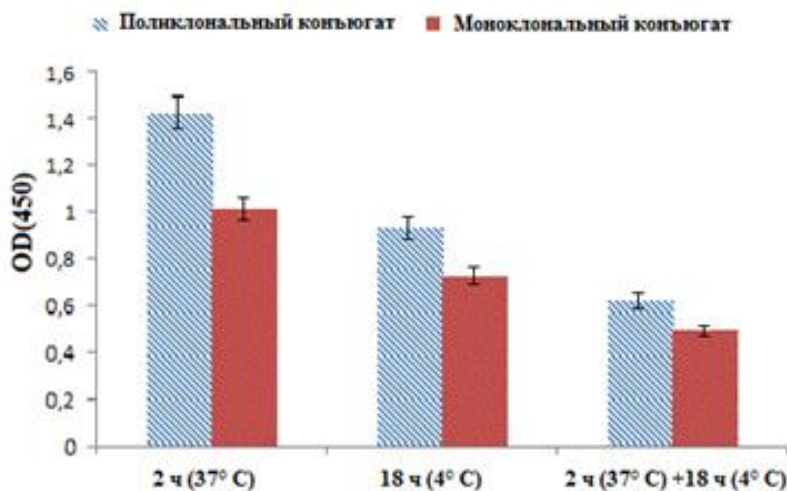


Рис. 2. Определение оптимальных условий сенсibilизации супернатантов токсигенных холерных вибрионов в планшетном варианте ТИФА.

По горизонтали: время и температура экспозиции адсорбции токсина в лунках планшета; по вертикали: средние значения оптических плотностей в ТИФА

[Determination of optimal conditions for sensitization of supernatants of toxigenic cholerae vibrios in the ELISA plate version.

Horizontal: time and temperature of toxin adsorption exposure in the wells of the plate; vertical: mean values of optical densities in the ELISA test]

С целью снижения неспецифической реакции были проведены исследования по уменьшению фоновых «помех» при использовании различных концентраций 0,5, 1, 2% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 5%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, 1% сухого обезжиренного молока в фосфатно-солевом буфере pH 7.4. Результаты экспериментов показали, что блокирование свободных центров связывания на планшете целесообразно проводить 1%-ным раствором БСА в ФСБ pH 7.4, поскольку его использование уменьшало фоновые «помехи», при этом увеличение концентрации БСА не влияло на результаты.

Следующий этап наших исследований включал определение оптимального рабочего разведения полученных конъюгатов, дающих максимальную цветовую реакцию при внесении их в полистироловые планшеты. Рабочее разведение моноклонального пероксидазного конъюгата составило 1:32, а поликлонального – 1:64, чувствительность метода – 10 нг/мл ХТ [Якушева и др., 2020].

Для определения оптимальной продолжительности инкубации токсинсодержащих препаратов с конъюгатами в ТИФА оценивали интенсивность реакции в зависимости от времени экспозиции (30, 45, 60 мин.) при температуре 37°C. Полученные результаты свидетельствуют, что оптимальными условиями инкубирования пероксидазных конъюгатов с токсином на твердой фазе являются: время – 30 мин. и температура – 37°C, поскольку в этом диапазоне регистрировали увеличение ОП. Более продолжительное время инкубации конъюгатов с исследуемыми образцами увеличивало время постановки реакции и сопровождалось появлением фонового окрашивания.

Испытания оптимизированного ТИФА проводили согласно вышеописанным отработанным параметрам, результаты которого отражены в табл. 2.

Из данных таблицы следует, что используемые моно- и поликлональные пероксидазные конъюгаты специфичны, так как отсутствуют перекрестные реакции с нетоксигенными холерными вибрионами и представителями гетерологичных микроорганизмов. Согласно данным литературы, холерные вибрионы биовара Эль Тор, в отличие от генетически измененных вариантов, обладают низкой токсинопродуцирующей способностью [Шашкова и др., 2011]. В наших опытах при взаимодействии супернатантов с поли- и моноклональными конъюгатами зарегистрированы высокие значения ОП порядка (1.522±0.021–1.812±0.010) в отношении геновариантов вибрионов биовара Эль Тор и *V. cholerae* Classical в сравнении с

положительным контролем (1.618±0.013). В то же время типичные вибрионы продуцируют токсина в два-три раза меньше, что подтверждают показатели ОП, максимальное значение которых равняется 0.581±0.026.

Таблица 2

Результаты определения активности и специфичности моно - и поликлональных пероксидазных конъюгатов в прямом методе ТИФА

[Results of activity and specificity determination of mono- and polyclonal peroxidase conjugates in the direct method ELISA]

Штаммы	Кол-во штаммов	Оптическая плотность (ОП)	
		Поликлональный конъюгат	Моноклональный конъюгат
<i>Vibrio cholerae</i> O1 Classical ctx+	3	1.812±0.010	1.407±0.012
<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor ctx+	2	1.522±0.021	1.204±0.007
<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor ctx+	9	0.581±0.026	0.508±0.011
<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor ctx-	5	0.102±0.004	0.108±0.005
<i>Vibrio cholerae</i> O139 ctx+	3	0.494±0.007	0.416±0.003
<i>Escherichia coli</i>	2	0.114±0.004	0.113±0.005
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	0.112±0.002	0.104±0.004
<i>Salmonella typhimurium</i>	2	0.116±0.005	0.116±0.004
Положительный контроль ХТ 0,05 мкг/мл		1.618±0.013	0.116±0.004
Отрицательный контроль среда АК1		0.090±0.009	0.087±0.003

Примечание. В таблице представлены средние значения оптических плотностей (ОП) и стандартное отклонение.

Заключение

Установлены оптимальные параметры и условия постановки прямого варианта ТИФА: сенсibilизация планшета токсинсодержащими препаратами, разведёнными в ФСБ pH 7.4 до 1:2–1:4, блокирование свободных сайтов связывания 1%-ным раствором БСА в ФСБ, время экспозиции опытных образцов с полистиролом планшета – 2 ч. (37°C), рабочее разведение конъюгатов 1:32–1:64, время инкубирования конъюгатов с ХТ на твёрдой фазе – 30 мин. при 37°C.

В итоговых испытаниях на штаммах установлена высокая специфичность и чувствительность тест-системы, что свидетельствует о возможности её использования для обнаружения токсигенных штаммов холерных вибрионов O1, O139 в качестве альтернативы сэндвич-варианту ГМ₁ИФА.

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. Баранова Е.В. и др. Конструирование иммунохроматографического теста на основе моноклональных антител для выявления холерного токсина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2020. Т. 16, № 2. С. 18–27.
4. Егоров А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высш. шк., 1991. 288 с.
5. Курчева С.А. и др. Разработка диагностической тест-системы для выявления специфических антигенов к возбудителю бруцеллеза в непрямом методе иммуноферментного анализа // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 2. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24244>.
6. Михеева Е.А. и др. Получение и характеристика антителопродуцирующих гибридом и моноклональных иммуноглобулинов к энтеротоксину *Vibrio cholerae* // Биотехнология. 2014. Т. 30, № 3. С. 49–54.
7. Петрова Е.Э. и др. Получение и характеристика моноклональных антител к холерному токсину // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35, № 3. С. 357–367.
8. Шашкова А.В. и др. Фенотипический и молекулярно-генетический анализ генетически измененного токсигенного штамма *V. cholerae* 301 биовара Эль Тор, изолированного в 2011 г. в России // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. № 14. С. 61–64.
9. 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. 2020. Т. 16, № 2. С. 37–43.
10. Ahn-Yoon S. et al. Ganglioside-liposome immunoassay for the ultrasensitive detection of cholera toxin // Analytical Chemistry. 2003. Vol. 75, № 10. P. 2256–2261. doi: 10.1021/ac026428t.
11. Bayat M. et al. Corrigendum to "Development of IgY-Based Sandwich ELISA as a Robust Tool for Rapid Detection and Discrimination of Toxigenic *Vibrio cholerae* // Canadian Journal of Infectious Diseases and

Medical Microbiology. 2019. doi: 10.1155/2019/4164982.

12. Crowther John R. *Molecular Biology Techniques, ELISA Guide*. Second edition. Humana Press, part of Springer Science + Business Media, LLC 2009.

13. Greig D.R. et al. A real-time multiplex PCR for the identification and typing of *Vibrio cholerae* // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2018. Vol. 90, № 3. P. 171–176. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.

14. Hossain Z.Z. et al. Quantitative Analysis of Nucleic Acid Extraction Methods for *Vibrio cholerae* Using Real-time PCR and Conventional PCR // *Mymensingh Medical Journal*. 2018. Vol. 27, № 2. P. 327–335.

15. 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.

16. Jin D. et al. Quantitative detection of *Vibrio cholera* toxin by real-time and dynamic cytotoxicity monitoring // *Journal of Clinical Microbiology*. 2013. Vol. 51, № 12. P. 3968–3974. doi: 10.1128/JCM.01959-13.

17. Mehrabadi J.F. et al. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* with new multiplex PCR // *Journal of Infection and Public Health*. 2012. Vol. 5, № 3. P. 263–267. doi: 10.1016/j.jiph.2012.02.004.

18. 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 Journal of Microbiology*. 2016. Vol. 56, № 3. P. 379–382. doi: 10.1007/s12088-016-0596-2.

19. Shlyapnikov Y.M. et al. Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins. // *Analytical Chemistry*. 2012. Vol. 84, № 13. P. 5596–6603. doi: 10.1021/ac300567f.

20. Tuteja U. et al. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA // *Journal of Medical Microbiology*. 2007. Vol. 56, № 10. P. 1340–1345. doi: 10.1099 / jmm.0.47166-0.

References

1. 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.).

2. Ashmarin I.P., Vorobiev A.A. *Statističeskie metody v mikrobiologičeskich issledovsnijach* [Statistical methods in microbiological research]. Leningrad, Medgiz Publ., 1962. 180 p. (In Russ.).

3. Baranova E.V., Vetchinin S.S., Shevyakov A.G., Soloviev P.V., Mironova L.V., Ponomareva A.S., Basso E.A., Khunkheeva J.Yu., Kruglikov V.D., Alekseeva L.P., Biketov S.F. [Construction of an immunochromatographic test based on monoclonal antibodies]. *Vestnik bioteknologii i fiziko-chimicheskoj biologii im. Yu.A. Ovčinnikova*. V. 16, No 2 (2020): pp. 18-27. (In Russ.).

4. Egorov A.M., Osipov B.B., Dzantiev E.M., Gavrilova A.P. *Teorija i praktika immunofermentmogo analiza* [Theory and practice of enzyme immunoassay]. Moscow, Vysšaja škola Publ., 1991. 288 p. (In Russ.).

5. Kurcheva S.A., Tyumentseva I.S., Afanasyev E.N., Zhdanova E.V., Startseva O.L., Zharnikova I.V., Garkusha Yu.Yu., Semircheva A.A. [Development of a diagnostic test system for detecting specific antibodies to the pathogen of brucellosis in an indirect method of enzyme immunoassay]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*. No 2 (2016). URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24244>. (In Russ.).

6. Mikheeva E.A., Devdariani Z.L., Osina N.A., Zakharova T.L. [Obtaining and characterization of antibody-producing hybridomas and monoclonal immunoglobulins to *Vibrio cholerae* enterotoxin]. *Biotechnologija*. V. 30, No 3 (2014): pp. 49-54. (In Russ.).

7. Petrova E.E., Komaleva R.L., Lakhtina O.E., Samokhvalova L.V., Kalinina N.A., Shoshina N.S., Rubina A.Yu., Filippova M.A., Vertiev Yu.V., Valyakina T.I., Grishin E.V. [Obtaining and characterization of monoclonal antibodies to cholera toxin]. *Bioorganičeskaja chimija*. V. 35, No 3 (2009): pp. 357-367. (In Russ.).

8. Shashkova A.V., Agafonov D.A., Cherkasov A.V., Zadnova S.P., Smirnova N.I. [Phenotypic and molecular genetic analysis of a genetically modified toxigenic strain of *V. cholerae* 301 biovar El Tor, isolated in 2011 in Russia]. *Problemy osobo opasnykh infekcij*. No 14 (2011): pp. 61-64. (In Russ.).

9. 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 (2020): pp. 37-43. (In Russ.).

10. Ahn-Yoon S., DeCory T.R., Baeumner A.J., Durst R.A. Ganglioside-liposome immunoassay for the ultrasensitive detection of cholera toxin. *Analytical Chemistry*. V. 75, No 10 (2003): pp. 2256-2261. doi: 10.1021/ac026428t.

11. Bayat M., Khabiri A., Hemati B. Corrigendum to "Development of IgY-Based Sandwich ELISA as a Robust Tool for Rapid Detection and Discrimination of Toxigenic *Vibrio cholera*. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. (2019). doi: 10.1155/2019/4164982.

12. Crowther John R. *Molecular Biology Techniques, ELISA Guide*. Second edition. Humana Press, part of Springer Science + Business Media, LLC, 2009.

13. Greig D.R., Hickey T.J., Boxall M.D., Begum H., Gentle A., Jenkins C., Chattaway M.A. A real-time multiplex PCR for the identification and typing of *Vibrio cholera*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. V. 90, No 3 (2018): pp. 171-176. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.
14. Hossain Z.Z., Ferdous J., Tulsiani S.M., Jensen P.M., Begum A. Quantitative Analysis of Nucleic Acid Extraction Methods for *Vibrio cholerae* Using Real-time PCR and Conventional PCR. *Mymensingh Medical Journal*. V. 27, No 2 (2018): pp. 327-335.
15. 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.
16. Jin D., Luo Y., Zheng M., Li H., Zhang J., Stampfl M., Xu X., Ding G., Zhang Y., Tang Yi-Wei. Quantitative detection of *Vibrio cholera* toxin by real-time and dynamic cytotoxicity monitoring. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 51, No 12 (2013): pp. 3968-3974. doi: 10.1128/JCM.01959-13.
17. Mehrabadi J.F., Morsali P., Nejad H.R., Fooladi A.A.I. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* with new multiplex PCR. *Journal of Infection and Public Health*. V. 5, No 3 (2012): pp. 263-267. doi: 10.1016/j.jiph.2012.02.004.
18. 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 Journal of Microbiology*. V. 56, No 3 (2016): pp. 379-382. doi: 10.1007/s12088-016-0596-2.
19. Shlyapnikov Y.M., Shlyapnikova E.A., Simonova M.A., Shepelyakovskaya A.O., Brovko F.A., Komaleva R.L., Grishin E.V., Morozov V.N. Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins. *Analytical Chemistry*. V. 84, No 13 (2012): pp. 5596-6603. doi: 10.1021/ac300567f.
20. Tuteja U., Kumar S., Shukla J., Kingston J., Batra H.V. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. *Journal of Medical Microbiology*. 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 15.09.2022; принята к публикации 29.11.2022.

The article was submitted 23.05.2022; approved after reviewing 15.09.2022; accepted for publication 29.11.2022.

Информация об авторах

Людмила Павловна Алексеева – lpalekseeva@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9866-3579>, д-р биол. наук, профессор;

Ольга Александровна Якушева – yakusheva_oa@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8159-7547>, науч. сотрудник;

Вероника Вячеславовна Евдокимова – evdokimova_vv@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>, канд. биол. наук, науч. сотрудник;

Михаил Эдуардович Яговкин – yagovkin_me@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8414-4965>, науч. сотрудник;

Вера Павловна Зюзина – zuzina_vp@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3100-0049>, канд. биол. наук, старший науч. сотрудник.

Information about the authors

Lyudmila P. Alekseeva – lpalekseeva@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9866-3579>, doctor of biological sciences, professor;

Olga A. Yakusheva – yakusheva_oa@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8159-7547>, research associate;

Veronika V. Evdokimova – evdokimova_vv@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>, candidate of biological sciences, researcher;

Mikhail E. Yagovkin – yagovkin_me@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8414-4965>, research associate;

Vera P. Zuzina – zuzina_vp@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3100-0049>, candidate of biological sciences, senior researcher.

Вклад авторов:

Алексеева Л. П. – научное руководство; концепция исследования; итоговые выводы.

Якушева О. А. – написание исходного текста; статистическая обработка материала.

Евдокимова В. В. – анализ данных; доработка текста; итоговые выводы.

Яговкин М. Э. – анализ и интерпретация результатов работы, критический пересмотр содержания.

Зюзина В. П. – анализ литературы, ответственность за все аспекты работы, надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с достоверностью данных и целостностью всех частей статьи.

Contribution of the authors:

Alekseeva L. P. - scientific management; conceptual studies; capture results.

Yakusheva O. A. – writing the original text; statistical processing of the material.

Evdokimova V. V. – data analysis; text revision; survey results.

Yagovkin M. E. – analysis and interpretation of the results of the work, revision of the content.

Zuzina 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.