

Разработка биплексного экспресс-теста для выявления эпидемически значимых штаммов *Vibrio cholerae*

Е.В.Баранова, А.Г.Королёва-Ушакова, А.Г.Шевяков, Т.В.Фёдоров, П.В.Соловьёв,
А.А.Горбатов, А.Е.Хомяков, С.Ф.Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Потенциал эпидемической опасности бактерий *Vibrio cholerae*, циркулирующих в природе, определяется способностью к продукции комплекса факторов патогенности, в первую очередь холерного токсина. С другой стороны, опыт вспышек и эпидемий холеры указывает на то, что наиболее часто они вызываются штаммами *V. cholerae* серогруппы O1. Мембранный иммунохроматографический анализ с наночастицами золота в качестве репортеров сигнала является востребованным инструментом экспресс-диагностики ряда возбудителей инфекционных заболеваний, в т.ч. и особо опасных. На основе моноклональных антител к холерному токсину и липополисахариду *V. cholerae* O1 разработан иммунохроматографический тест (ИХТ) для одновременного выявления O1- и Tox⁺-маркеров *V. cholerae*. Проведена наработка экспериментальных серий ИХТ «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺». Представлены предварительные результаты исследования рабочих характеристик разработанного ИХТ с использованием бульонных культур 10 штаммов *V. cholerae*. Показано, что чувствительность ИХТ при определении липополисахарида *V. cholerae* серогруппы O1 составила 100%, при определении холерного токсина – 87,5%.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холерный токсин, серогруппа O1, иммунохроматография, экспресс-тест

Для цитирования: Баранова Е.В., Королёва-Ушакова А.Г., Шевяков А.Г., Фёдоров Т.В., Соловьёв П.В., Горбатов А.А., Хомяков А.Е., Бикетов С.Ф. Разработка биплексного экспресс-теста для выявления эпидемически значимых штаммов *Vibrio cholerae*. Бактериология. 2024; 9(4): 8–14. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-8-14

Development of a biplex rapid test to identify epidemiologically significant strains of *Vibrio cholerae*

E.V.Baranova, A.G.Korolyova-Ushakova, A.G.Shevyakov, T.V.Fedorov, P.V.Soloviev,
A.A.Gorbatov, A.E.Khomyakov, S.F.Biketov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow region,
Russian Federation

The potential for epidemic danger of *Vibrio cholerae* bacteria circulating in nature determine by the ability to produce a complex of pathogenicity factors, primarily cholera toxin (CT). On the other hand, experience with cholera outbreaks and epidemics indicates that they most often caused by *V. cholerae*, which belongs to serogroup O1. Membrane immunochromatographic analysis with gold nanoparticles as signal reporters is a popular tool for express diagnostics of a number of infectious pathogens, including highly dangerous ones. Based on monoclonal antibodies to cholera toxin and to lipopolysaccharide *V. cholerae* O1, developed an immunochromatographic test (ICT) for the simultaneous detection of O1 and Tox⁺ markers of *V. cholerae*. Experimental batches of ICT “*V. cholerae* O1 Tox⁺ test strip” were developed. In this paper, the team of authors presents the preliminary results of a study of the working characteristics of 10 strains of *V. cholerae* strains developed by ICT using broth cultures of 10 strains of *V. cholerae* strains. It was shown that the sensitivity of ICT in the determination of LPS of *V. cholerae* serogroup O1 was 100%, in the determination of cholera toxin – 87.5%.

Key words: *Vibrio cholerae*, cholera toxin, serogroup O1, immunochromatography, rapid test

For citation: Baranova E.V., Korolyova-Ushakova A.G., Shevyakov A.G., Fedorov T.V., Soloviev P.V., Gorbatov A.A., Khomyakov A.E., Biketov S.F. Development of a biplex rapid test to identify epidemiologically significant strains of *Vibrio cholerae*. Bacteriology. 2024; 9(4): 8–14. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-8-14

Для корреспонденции:

Баранова Евгения Владимировна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская обл., 142279 Российская Федерация
Телефон: (4967) 36-01-47

Статья поступила 10.10.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Evgenia V. Baranova, MD, PhD, Senior Researcher, Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-01-47

The article was received 10.10.2024, accepted for publication 25.12.2024

В настоящее время сохраняются эпидемиологические риски завоза холеры из эндемичных стран на любую административную территорию Российской Федерации. Кроме этого, имеются риски эпидемического проявления холеры на территориях субъектов Российской Федерации, находящихся в условиях чрезвычайной ситуации, в связи с контактами людей с водными объектами, загрязненными холерными вибрионами. Россия постоянно сталкивается с импортированными возбудителями инфекции, за счет которых формируются местные очаги холеры. В условиях отсутствия эпидемических проявлений холеры не исключается вероятность эпизодического обнаружения в пробах воды токсигенных штаммов O1-серогруппы вследствие неустоенных заносов с неблагополучных по холере территорий [1]. По данным Референс-центра по холере, на территории России в последние годы холерные вибрионы были выделены из объектов окружающей среды на территориях Донецкой Народной Республики, Ростовской области, Республики Калмыкия, Краснодарского края, Иркутской области, Забайкальского края, Республик Бурятия и Коми, Хабаровского края.

Рост заболеваемости холерой в мире наблюдается с 2021 г. С начала 2024 г. по состоянию на сентябрь 2024 г. в общей сложности было зарегистрировано 429 700 случаев холеры и 3400 случаев смерти от этого заболевания в 31 стране в пяти регионах, наблюдаемых Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) [2]. В настоящее время к числу стран, наиболее серьезно затронутых этим заболеванием, относятся Афганистан, Пакистан, Йемен, Сирия, Зимбабве, Замбия, Эфиопия, Мозамбик, Гаити, Демократическая Республика Конго, Сомали, Судан, Коморские острова, Мьянма, Индия, Нигерия, Танзания. В ряде вспышек отмечаются высокие показатели летальности, превышающие пороговый уровень в 1%. Данные показатели свидетельствуют о неуклонном росте количества заболевших.

Интерес к средствам экспресс-выявления возбудителя холеры определяется стремлением получить результаты исследования в максимально короткие сроки; возможностью проведения анализа с использованием нативного материала или элективных сред; высокой специфичностью, простотой и воспроизводимостью метода. Поэтому в последние годы экспресс-тесты (в англоязычной литературе: Rapid test, LF-test, LF-biosensor) для обнаружения холерного вибриона все чаще применяются при возникновении вспышек в эндемичных регионах Африки и Азии при решении вопроса организации противоэпидемических мероприятий.

Иммунохроматографические тесты (ИХТ) могут использоваться персоналом у постели больного или в месте оказания помощи больным с подозрением на холеру и не требуют создания и обслуживания «холодовой транспортной цепи» или использования сложного оборудования. При расследовании случаев холеры в условиях недостаточных лабораторных ресурсов ИХТ были рекомендованы ВОЗ для выявления возбудителя холеры при реагировании на вспышки, хотя до сих пор нет рекомендаций по их систематическому использованию в целях мониторинга за возбудителем [3, 4]. Биосенсоры на основе иммунохроматографического анализа (ИХА) позволяют в течение 5–20 мин обнаружить патоген в исследуемом образце. На рис. 1 приведена схема работы ИХТ для выявления антигенов.

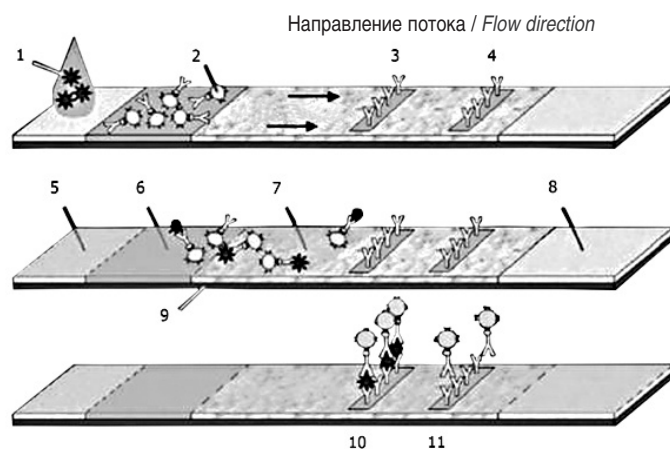


Рис. 1. Принцип работы ИХТ для выявления антигенов: 1 – исследуемая проба; 2 – конъюгат специфических антител с наночастицами; 3 – иммобилизованные специфичные антитела в тестовой зоне; 4 – иммобилизованные антивидовые иммуноглобулины в контрольной зоне; 5 – подушечка для впитывания пробы; 6 – подушечка для конъюгата; 7 – нитроцеллюлозная мембрана; 8 – подушечка для абсорбции реагентов; 9 – подложка для мембраны; 10 – тестовая полоска; 11 – контрольная полоска.

Fig. 1. Operating principle of the ICT for detection of antigens: 1 – test sample; 2 – conjugate of specific antibodies with nanoparticles; 3 – immobilized specific antibodies in the test zone; 4 – immobilized anti-species immunoglobulins in the control zone; 5 – pad for sample absorption; 6 – pad for conjugate; 7 – nitrocellulose membrane; 8 – pad for reagent absorption; 9 – membrane substrate; 10 – test strip; 11 – control strip.

За рубежом производится ряд ИХТ для выявления холерных вибрионов O1, O139 серогрупп и холерного токсина (ХТ) [5–8]. Одной из целей при разработке быстрых тестов для обнаружения возбудителя холеры является достижение чувствительности и специфичности не менее 90 и 85% соответственно (рекомендация целевой группы ВОЗ по борьбе с холерой) [9].

Цель исследования. Разработка первого отечественного ИХТ для одновременного выявления O1- и Tox⁺-маркеров патогенных штаммов *Vibrio cholerae*. В данной статье представлены основные этапы работы по созданию ИХТ «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» и результаты лабораторно-экспериментального исследования его рабочих характеристик.

Материалы и методы

В работе использовали микробиологические, биохимические, иммунохимические методы и методы гибридной технологии. Материалом для исследований явились моноклональные антитела к липополисахариду (ЛПС) *V. cholerae* O1 серогруппы и к ХТ. Работы проводились на базе отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск.

Микроорганизмы

Штаммы холерного вибриона и гетерологичных микроорганизмов получены из Коллекции патогенных бактерий ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (в рамках выполненных работ по контракту №203А/2023) и из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ. Штаммы холерного вибриона и гетерологичных микроорганизмов: *V. cholerae* O139 59 Din; *V. cholerae* O139 И-13;

V. cholerae El Tor И-1334; *V. cholerae* El Tor И-1181; *V. cholerae* 569В; *V. cholerae* O139 И-16; *V. cholerae* El Tor И-1327; *V. cholerae* El Tor И-576; *V. cholerae* El Tor И-1264; *V. cholerae* El Tor И-477; *V. cholerae* не O1/O139 1-09; *V. cholerae* не O1/O139 1-11; *V. cholerae* не O1/O139 1-12; *V. metschnikovii* 5; *V. vulnificus* И-157; *V. parahaemolyticus* И-188; *Escherichia coli* 52; *Shigella dysenteriae* 63/2; *Salmonella* Typhimurium 14.

Получение ЛПС *V. cholerae* O1

ЛПС *V. cholerae* O1 выделен и очищен из штамма *V. cholerae* 569В по методу O.Westphal и K.Jann [10].

Получение холерного токсина

ХТ выделен по методу J.J.Mekalanos из фильтрата бульонной культуры штамма *V. cholerae* 569В [11].

Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител

Моноклональные антитела (МКА) получали с использованием ЛПС *V. cholerae* O1, ХТ и мышей линии BALB/c. Для гибридизации были использованы подколенные лимфоузлы иммунизированных мышей. Гибридизацию иммунных лимфоцитов и клеток мышиной миеломы линии РЗ-Х63-Аg8.653 проводили по стандартной методике [12] при помощи полиэтиленгликоля 4000. Тестирование супернатантов гибридом проводили на 7–9-й день после гибридизации методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Выделение и очистку МКА из культуральных и асцитических жидкостей проводили на колонке с белок А сефарозой. Выделенные иммуноглобулины концентрировали осаждением при помощи сухого сульфата аммония (до 50% насыщения) и переводили в фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 емкостью 10 мл по прилагаемой инструкции.

Методы анализа МКА

Определение константы аффинности МКА проводили методом ИФА по J.D.Beatty [13]. Анализ специфической активности МКА проводили с использованием методов дот-блот [14], вестерн-блот [15] и ИФА [16].

Синтез коллоидного золота с размером частиц 40 нм

К 48,5 мл деионизованной воды (18,2 Мом/см) добавляли при постоянном перемешивании 150 мкл 10%-го раствора золотохлористоводородной кислоты. Смесь доводили до кипения, добавляли 1,5 мл 1%-го раствора цитрата натрия. Смесь продолжали кипятить с перемешиванием 25 мин до появления устойчивой рубиново-красной окраски. Полученную суспензию коллоидного золота (КЗ) охлаждали до комнатной температуры и хранили при температуре 4–6°C. Оптическую плотность раствора КЗ определяли спектрофотометрически. Определение флуккуляционных кривых проводили по G.T.Hermanson [17].

Материалы и оборудование для изготовления лабораторных образцов набора реагентов «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox+»

В работе использовали мембранные материалы (Advanced Microdevices, Индия), диспенсер IsoFlow (Imagene Technology,

США) для формирования аналитических и контрольной зон, автоматический гильотинный нарезчик ИХТ Index Cutter (A-Point Technologies, США), климатическую камеру (Mettler, Германия), запаиватель с микроконвейером FR-900 (Wenzhou dingli packing machinery, Китай), вакуумный упаковщик Boxer 35 (Henkelman, Нидерланды).

Проведение иммунохроматографического анализа

Для проведения ИХА использовали разработанный при выполнении данной работы набор реагентов «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox+» для одновременного выявления O1- и Tox+ маркеров патогенных штаммов *V. cholerae* производства ФБУН ГНЦ ПМБ (лабораторная серия 8, произведен 15.02.2024). ИХА проводили согласно проекту инструкции по применению набора реагентов. С помощью автоматического дозатора с наконечником вносили 150 мкл исследуемого образца в пробирки для проведения анализа, туда же помещали тест-полоски. Учет результата проводили через 20 мин в соответствии со схемой интерпретации результатов (рис. 2).

Образец считали отрицательным на наличие ХТ и ЛПС *V. cholerae* O1, если имеется одна окрашенная линия в контрольной зоне.

Образец считали положительным на наличие ХТ, если имеются окрашенные линии в тестовой зоне 1 и в контрольной зоне.

Образец считали положительным на наличие ЛПС *V. cholerae* O1, если имеются окрашенные линии в тестовой зоне 2 и в контрольной зоне.

Анализ считали не валидным в случае отсутствия окрашивания линии в контрольной зоне.

Результаты исследования и их обсуждение

Получение и характеристика МКА, специфичных к ЛПС *V. cholerae* O1 и ХТ *V. cholerae*

Работу проводили согласно методикам, представленным в разделе «Материалы и методы». Наиболее важным этапом работы являлся отбор гибридомных клеток с перспективой дальнейшего использования полученных МКА в каче-

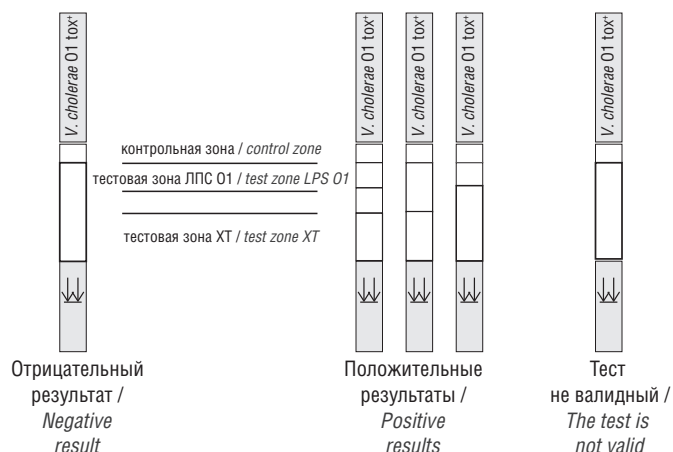


Рис. 2. Интерпретация результата анализа с использованием набора реагентов «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox+».

Fig. 2. Interpretation of the test result using the reagent kit "Test strip *V. cholerae* O1 Tox+".

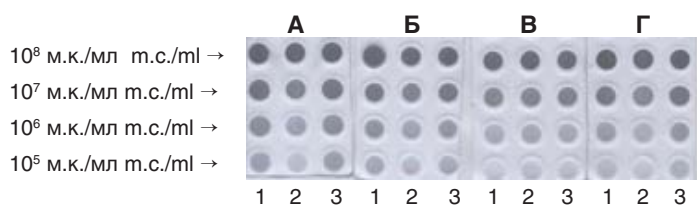


Рис. 3. Дот-блот моноклональных антител к ЛПС *V. cholerae* O1: 1 – *V. cholerae* EI Tor I-1181; 2 – *V. cholerae* EI Tor I-1264; 3 – *V. cholerae* 569B. А – дот-блот МА 2G12; Б – дот-блот МА 1C4; В – дот-блот МА 6D8; Г – дот-блот МА 3E7.

Fig. 3. Dot blot of monoclonal antibodies to LPS *V. cholerae* O1: 1 – *V. cholerae* EI Tor I-1181; 2 – *V. cholerae* EI Tor I-1264; 3 – *V. cholerae* 569B. A – dot blot MA 2G12; B – dot blot MA 1C4; C – dot blot MA 6D8; G – dot blot MA 3E7.

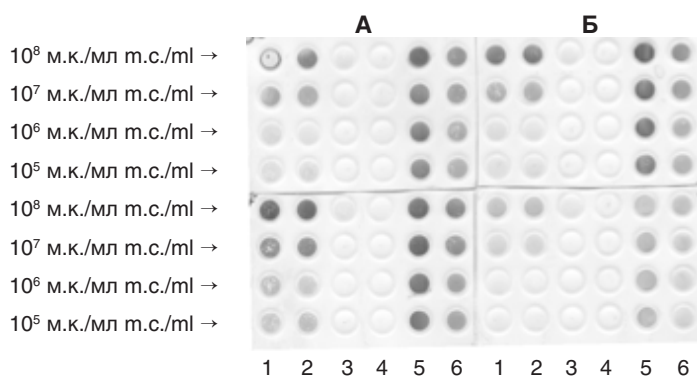


Рис. 4. Дот-блот моноклональных антител к холерному токсину. Препараты микробных клеток: 1 – *V. cholerae* EI Tor I-1181; 2 – *V. cholerae* EI Tor I-1264; 3 – *V. cholerae* O139 I-16; 4 – *V. cholerae* EI Tor I-1327; 5 – *V. cholerae* 569B; 6 – *V. cholerae* EI Tor I-1334. А – дот-блот МА CH6; Б – дот-блот МА CE5; В – дот-блот МА CH13; Г – дот-блот МА CH8.

Fig. 4. Dot blot of monoclonal antibodies to cholera toxin. Microbial cell preparations: 1 – *V. cholerae* EI Tor I-1181; 2 – *V. cholerae* EI Tor I-1264; 3 – *V. cholerae* O139 I-16; 4 – *V. cholerae* EI Tor I-1327; 5 – *V. cholerae* 569B; 6 – *V. cholerae* EI Tor I-1334. A – dot blot MA CH6; B – dot blot MA CE5; C – dot blot MA CH13; G – dot blot MA CH8.

стве компонентов ИХТ. С учетом поставленной перед нами задачи были сформулированы определенные требования отбора гибридных клеток, включающие следующие параметры:

а) стабильность клеточной линии – не менее 5 успешных пересевов на питательной среде и не менее 5 успешных пассажей на мышах линии BALB/с без снижения специфической активности;

б) продуктивность гибридом – не менее 0,1 мг иммуноглобулинов на 1 мл культуральной жидкости и не менее 2 мг – на 1 мл асцита;

в) специфичность МКА – взаимодействие с антигенами и целыми клетками холерного вибриона, отсутствие перекрестных реакций с вибрионами других видов и гетерологичными микроорганизмами;

г) аффинность МКА – константа аффинности к антигенам и целым клеткам холерного вибриона не ниже 10^8 M^{-1} ;

д) класс МКА – иммуноглобулины класса G.

Гибридные клоны, показавших наибольшую активность в ИФА, были клонированы 2–4 раза методом предельных разведений.

Селекцию МКА к ЛПС O1 серогруппы возбудителя холеры и ХТ проводили путем оценки их диагностической ценности в ИФА, методами дот-блот и вестерн-блот. На рис. 3 пред-

ставлен пример дот-блота МКА к ЛПС *V. cholerae* O1 серогруппы с цельными клетками холерного вибриона O1 серогруппы. Чувствительность МКА 2G12 в дот-блоте составила 10^5 м.к./мл .

На рис. 4 представлен пример дот-блота МКА к ХТ с микробными клетками холерного вибриона. Чувствительность МА CH13 составила 10^5 м.к./мл .

Подбор пар аддитивных высокоаффинных МКА к ЛПС O1 серогруппы холерного вибриона и ХТ проводили в сэндвич-варианте ИФА с использованием биотинилированных МКА. Для выявления ЛПС холерного вибриона серогруппы O1 установлено 3 пары МКА: 2G12 – 1C4-биотин; 6D8 – 1C4-биотин; 6D8 – 3E7-биотин, а для выявления ХТ – две пары МКА: CH13 – CE5-биотин и CH6 – CE5-биотин. Результаты, полученные в ряде иммунохимических исследований, позволили нам рассматривать полученные МКА в качестве перспективных биоконструктивных компонентов для конструирования иммунохроматографического экспресс-теста для одновременного выявления O1- и Tox⁺-маркеров патогенных штаммов *V. cholerae*.

Конструирование лабораторных образцов иммунохроматографического экспресс-теста для одновременного выявления O1- и Tox⁺-маркеров патогенных штаммов *V. cholerae* «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺»

Принцип ИХА для одновременного (биплексного) выявления O1- и Tox⁺-маркеров патогенных штаммов *V. cholerae*

На первой стадии ИХА происходит взаимодействие коллоидных конъюгатов (№1 – конъюгат КЗ с токсин-связывающими МКА, №2 – конъюгат КЗ с ЛПС O1-связывающими МКА) с антигенами-мишенями экспресс-теста в исследуемой пробе. Затем фронт жидкости с образовавшимися иммунными комплексами антиген-антитело-КЗ последовательно проходит аналитическую зону 1, которая представляет собой участок мембраны с иммобилизованными МКА к ХТ, аналитическую зону 2, которая представляет собой участок мембраны с иммобилизованными МКА к ЛПС O1 группы холерного вибриона. Иммунный комплекс конъюгата КЗ с ХТ связывается с аналитической зоной 1, в результате чего образуется окрашенный преципитат. Соответственно иммунные комплексы конъюгата КЗ с ЛПС O1 серогруппы холерного вибриона связываются с аналитической зоной 2, в результате чего также образуется окрашенный преципитат. Степень связывания иммунных комплексов с иммобилизованными в аналитических зонах антителами и, соответственно, интенсивность окрашивания мембраны определяются концентрацией специфических холерных маркеров в исследуемой пробе. Контрольная зона представляет собой участок мембраны с иммобилизованными антимышиными антителами класса G кролика и окрашивается за счет связывания конъюгатов КЗ №1 и №2, независимо от наличия в пробе антигенов-мишеней. На рис. 5 представлен пример проведения исследования бульонных культур штаммов *V. cholerae* (10^7 м.к./мл).

Для конъюгирования с КЗ были взяты очищенные МКА к ХТ CE5 и 1C4 к ЛПС *V. cholerae* O1 серогруппы. Размер частиц золота в данных конъюгатах составлял 40 нм. Оптическая плотность КЗ при $\lambda = 540 \text{ нм}$ составляла 10,0 оптических единиц.

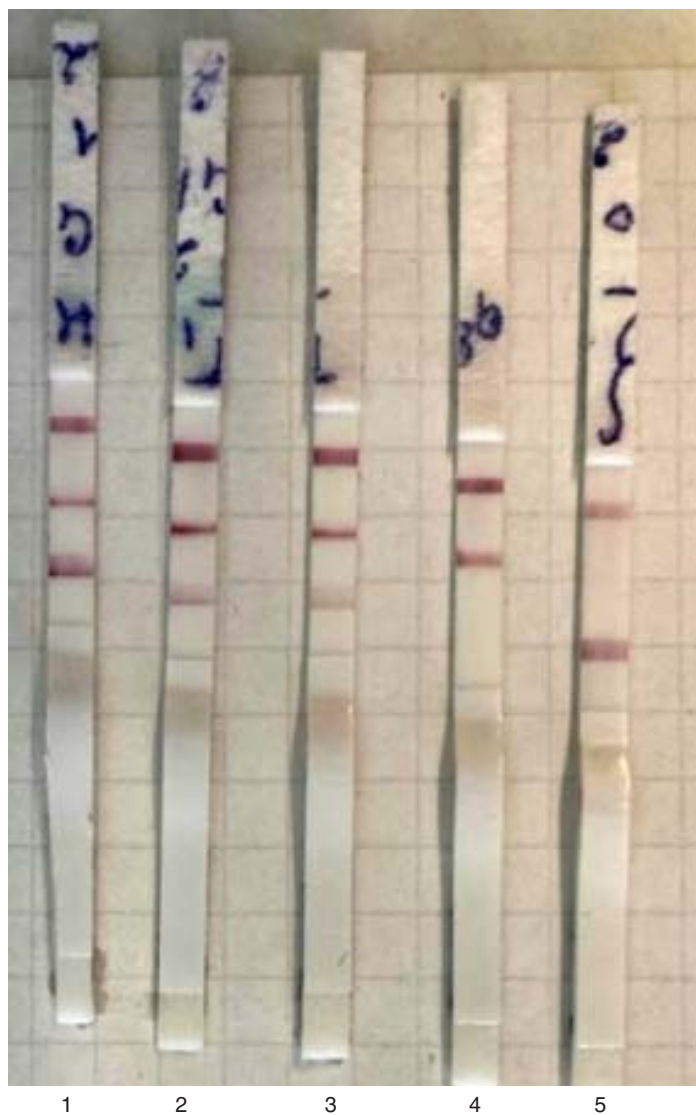


Рис. 5. Иммунохроматографический анализ бульонных культур штаммов *V. cholerae*. Бульонные культуры штаммов: 1 – *V. cholerae* 569B; 2 – *V. cholerae* EI Tor И-1334; 3 – *V. cholerae* EI Tor И-1181; 4 – *V. cholerae* EI Tor И-1327; 5 – *V. cholerae* O139 59 Din.
 Fig. 5. Immunochromatographic analysis of broth cultures of *V. cholerae* strains. Broth cultures of strains: 1 – *V. cholerae* 569B; 2 – *V. cholerae* EI Tor И-1334; 3 – *V. cholerae* EI Tor И-1181; 4 – *V. cholerae* EI Tor И-1327; 5 – *V. cholerae* O139 59 Din.

Для формирования аналитической зоны 1 на мембрану ИХТ наносили раствор МКА СН13 к ХТ в ФСБ. Для формирования аналитической зоны 2 на мембрану ИХТ наносили раствор МКА 2G12 к ЛПС *V. cholerae* O1серогруппы в ФСБ. Для формирования контрольной зоны на мембрану ИХТ наносили раствор антивидовых антител (кроличьи против иммуноглобулинов мыши, «ИМТЕК», Россия) в ФСБ.

При выборе материалов для конструирования экспресс-теста оценивали следующие параметры: сорбционная емкость, однородность формирующихся аналитических и контрольных зон, равномерное продвижение фронта жидкости при исследовании, а также низкий уровень неспецифической сорбции коллоидных конъюгатов на мембране.

Результаты экспериментального изучения рабочих характеристик набора реагентов «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺»

Для оценки специфичности экспресс-теста «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» использовали бульонные культуры в концентрации 10⁹ м.к./мл: *V. cholerae* не O1/O139 1-09; *V. cholerae* не O1/O139 1-11; *V. cholerae* не O1/O139 1-12; *E. coli* 52; *S. dysenteriae* 63/2; *V. metschnikovii* 5; *S. Typhimurium* 14; *V. vulnificus* И-157; *V. parahaemolyticus* И-188. В результате экспериментов установлено отсутствие перекрестного реагирования. Таким образом, образцы разработанного иммунохроматографического экспресс-теста для одновременного выявления O1- и Tox⁺-маркеров патогенных штаммов *V. cholerae* обладали 100%-й специфичностью в отношении близкородственных и гетерологичных микроорганизмов.

Чувствительность исследованных образцов экспресс-теста в отношении бульонных культур штаммов возбудителя холеры O1 группы в концентрации 10⁸ м.к./мл составила 100%. Чувствительность исследованных образцов экспресс-теста в отношении бульонных культур токсигенных штаммов *V. cholerae* EI Tor и классического биоваров в концентрации 10⁸ м.к./мл составила 87,5%. Так, из 8 взятых в исследование бульонных культур токсигенных штаммов *V. cholerae* с генотипом *ctxAB*⁺*tcpA*_{elt}⁺ (*V. cholerae* EI Tor O1 и *V. cholerae* O139) и *ctxAB*⁺*tcpA*_{elt}[–] (*V. cholerae* O1) в 7 (87,5%) обнаружено наличие ХТ. Штаммы *V. cholerae*, не содержащие в геноме детерминант ХТ (*V. cholerae* O139 И-16, *V. cholerae* EI Tor

Таблица. Результаты оценки чувствительности экспресс-теста «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺»
 Table. Results of the sensitivity assessment of the rapid test «Test strip *V. cholerae* O1 Tox⁺»

№ пп	Наименование и номер штамма / Name and number of strain	Генотип / genotype		Опыт 1 / Experiment 1		Опыт 2 / Experiment 2	
		<i>ctxAB</i>	<i>tcpA</i> _{elt}	выявлен ЛПС O1 / LPS O1 detected	выявлен ХТ / CT detected	выявлен ЛПС O1 / LPS O1 detected	выявлен ХТ / CT detected
1.	<i>V. cholerae</i> O139 59 Din	+	+	–	+	–	+
2.	<i>V. cholerae</i> O139 И-13	+	+	–	+	–	+
3.	<i>V. cholerae</i> EI Tor И-1334	+	+	+	+	+	+
4.	<i>V. cholerae</i> EI Tor И-1181	+	+	+	+	+	+
5.	<i>V. cholerae</i> 569B	+	–	+	+	+	+
6.	<i>V. cholerae</i> O139 И-16	–	–	–	–	–	–
7.	<i>V. cholerae</i> EI Tor И-1327	–	–	+	–	+	–
8.	<i>V. cholerae</i> EI Tor И-576	+	+	+	–	+	–
9.	<i>V. cholerae</i> EI Tor И-1264	+	+	+	+	+	+
10.	<i>V. cholerae</i> EI Tor И-477	+	+	+	+	+	+

И-1327), показали отрицательный результат тестирования экспресс-теста (таблица).

Таким образом, проведенное в двух повторах исследование показало, что аналитическая чувствительность исследования с использованием биплексного экспресс-теста «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» к ЛПС *V. cholerae* O1 для бульонных культур исследуемой группы штаммов составила 100% (с воспроизводимостью – 100%), аналитическая чувствительность на наличие у вибрионов маркера ХТ – 87,5% (с воспроизводимостью – 100%). Рабочие характеристики экспресс-теста, изготовленного из отечественных биокomпонентов, показывают перспективность его использования на практике для выявления маркеров эпидемически значимых штаммов *V. cholerae*. По результатам технических испытаний экспресс-теста «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» получено положительное заключение на соответствие требованиям нормативной, технической и эксплуатационной документации.

Обсуждение

Раннее выявление случаев заболевания холерой и их подтверждение имеют решающее значение для оперативно-го осуществления противоэпидемических мероприятий. За рубежом ряд ведущих мировых производителей выпускают ИХТ для выявления холерных вибрионов O1, O139 серогрупп и ХТ, которые обладают удовлетворительной диагностической точностью, соответствующей рекомендациям ВОЗ. При прямом тестировании образцов стула пациентов средняя чувствительность и специфичность ИХТ составляет 90 и 86% соответственно. С помощью мета-анализа проведена оценка диагностической точности экспресс-тестов для выявления холерного вибриона O1 серогруппы ряда ведущих мировых производителей [18]. Авторы провели поиск в четырех базах данных (Medline, EMBASE, Google Scholar и Web of Science до 8 сентября 2021 г.) в поисках исследований, в которых оценивали экспресс-тесты для выявления *V. cholerae* O1. Проведен двумерный мета-анализ случайных эффектов для расчета совокупной чувствительности и специфичности быстрых тестов на холеру. Всего в этот мета-анализ было включено 20 исследований: из Африки ($n = 11$), Азии ($n = 7$) и Америки (Гаити; $n = 2$). Авторы оценили 8 экспресс-тестов: Crystal VC-O1, Crystal VC, Cholkit, Cholera dipstick test (Institute Pasteur Paris), SD Bioline, Artron, Cholera Smart O1 и Smart II Cholera O1. По результатам мета-анализа был сделан вывод, что используемые методы экспресс-тестирования возбудителя холеры обладают умеренной чувствительностью и специфичностью, редко достигающими 100%. Отмечены различия в чувствительности и специфичности ИХТ различных производителей и зависимость от условий проведения анализа и времени от начала клинических проявлений заболевания [5, 6, 7, 19]. Учитывая тот факт, что количество вибрионов, присутствующих у пациентов с острой холерой, может достигать 10^9 КОЕ/мл стула [20], а чувствительность ИХТ обычно составляет $\sim 10^{7-8}$ КОЕ в мл, проблем с выявлением возбудителя в острой фазе заболевания с помощью разработанного ИХТ «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» быть не должно.

В России не производят тестов для прямого тестирования клинических образцов, поэтому разработка, испыта-

ния и внедрение в практику подобных ИХТ является актуальной задачей. Разработанный на основе МКА, полученных из гибридом, имеющихся в отделе иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ, экспресс-тест «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» позволяет определить в бульонных культурах одновременно два фактора патогенности возбудителя холеры – ЛПС *V. cholerae* O1 серогруппы и ХТ – с чувствительностью 100 и 87,5% соответственно. Специфичность теста составляет 100%. Планируется повысить его аналитическую чувствительность и адаптировать для прямого тестирования образцов стула пациентов.

Заключение

Традиционные методы определения токсигенности и серогрупповой принадлежности изолятов *V. cholerae* могут занять более трех дней, а также требуют хорошей лабораторной инфраструктуры, поэтому на сегодняшний день актуальна разработка экспрессных методов. Выявление одновременно двух маркеров – O1 и Tox⁺ – в одном изоляте *V. cholerae* несомненно указывает на его высокий потенциал эпидемической опасности. Представленные в данной работе предварительные результаты исследования рабочих характеристик разработанного ИХТ «Тест-полоска *V. cholerae* O1 Tox⁺» с использованием бульонных культур 10 штаммов *V. cholerae* показали, что чувствительность ИХТ при определении ЛПС *V. cholerae* серогруппы O1 составила 100%, при определении холерного токсина – 87,5%.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках федерального проекта «САНИТАРНЫЙ ЩИТ СТРАНЫ – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» по мероприятию «Разработка новых тестов для диагностики инфекций за 60 минут».

Financial support

The work was carried out within the framework of the federal project “SANITARY SHIELD of the COUNTRY – safety for health (prevention, detection, response)” for the event “Development of new tests for the diagnosis of infections in 60 minutes”.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Литература / References

1. Попова АЮ, Носков АК, Ежлова ЕБ, Кругликов ВД, Монахова ЕВ, Чемисова ОС, и др. Эпидемиологическая ситуация по холере в Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2024;1:76-88. / Popova AYU, Noskov AK, Ezhlava EB, Kruglikov VD, Monakhova EV, Chemisova OS, et al. Epidemiological Situation on Cholera in the Russian Federation in 2023 and Forecast for 2024. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2024;1:76-88. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-76-88 (In Russian).
2. WHO Global Cholera and AWD dashboard public [Electronic resource]. URL: <https://who-global-cholera-and-awd-dashboard-1-who.hub.arcgis.com/> (accessed 05.10.2024).

3. Ramamurthy T, Das B, Chakraborty S, Mukhopadhyay AK, Sack DA. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. Vaccine. 2020 Feb 29;38 Suppl 1:A73-A82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099
 4. Kanungo S, Azman AS, Ramamurthy T, Deen J, Dutta S. Cholera. Lancet. 2022 Apr 9;399(10333):1429-1440. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00330-0
 5. Kalluri P, Naheed A, Rahman S, Ansaruzzaman M, Faruque AS, Bird M, et al. Evaluation of three rapid diagnostic tests for cholera: does the skill level of the technician matter? Trop Med Int Health. 2006 Jan;11(1):49-55. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2005.01539.x
 6. Nato F, Boutonnier A, Rajerison M, Grosjean P, Darteville S, Guénolé A, et al. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 May;10(3):476-8. DOI: 10.1128/cdli.10.3.476-478.2003
 7. Wang XY, Ansaruzzaman M, Vaz R, Mondlane C, Lucas ME, von Seidlein L, et al. Field evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for the diagnosis of cholera in a high-risk population. BMC Infect Dis. 2006 Feb 1;6:17. DOI: 10.1186/1471-2334-6-17
 8. Sayeed MA, Islam K, Hossain M, Akter NJ, Alam MN, Sultana N, et al. Development of a new dipstick (Cholkit) for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 in acute watery diarrheal stools. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Mar 14;12(3):e0006286. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006286
 9. World Health Organization (WHO) Global Task Force on Cholera Control Surveillance Laboratory Working Group. The Use of Cholera Rapid Diagnostic Tests. URL: <https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2019/10/gtfcc-interim-use-of-cholera-rapid-diagnostic-tests.pdf>
 10. Westphal O, Jann K. Bacterial Lipopolysaccharides Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. Methods in Carbohydrate Chemistry. 1965;5:83-91.
 11. Mekalanos JJ, Collier RJ, Romig WR. Purification of cholera toxin and its subunits: new methods of preparation and the use of hypertoxinogenic mutants. Infect Immun. 1978 May;20(2):552-8. DOI: 10.1128/iai.20.2.552-558.1978
 12. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7. DOI: 10.1038/256495a0
 13. Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. J Immunol Methods. 1987 Jun 26;100(1-2):173-9. DOI: 10.1016/0022-1759(87)90187-6
 14. Kimball SR, Rannels SL, Elensky MB, Jefferson LS. Quantitation of proteins by dot-immunobinding assay. A comparison of visualization methods using eukaryotic initiation factor 2 and a monospecific antibody. J Immunol Methods. 1988 Feb 10;106(2):217-23. DOI: 10.1016/0022-1759(88)90200-1
 15. Renner SW. Immunoblotting and dot immunobinding. Emerging techniques in protein immunochemistry. Arch Pathol Lab Med. 1988 Aug;112(8):780-6.
 16. Егоров АМ, Осипов АП, Дзантиев ББ, Гаврилова ЕМ. Теория и практика иммуноферментного анализа. Т. 33. М.: Высш. шк., 1991;174-175. / Egorov AM, Osipov AP, Dzantiev BB, Gavrilova EM. Theory and practice of enzyme immunoassay. V. 33. M.: Higher school, 1991;174-175. (In Russian).
 17. Bioconjugate Techniques. ScienceDirect [Electronic resource]. URL: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123822390/bioconjugate-techniques> (accessed: 01.10.2024).
 18. Muzembo BA, Kitahara K, Ohno A, Debnath A, Okamoto K, Miyoshi SI. Cholera Rapid Diagnostic Tests for the Detection of *Vibrio cholerae* O1: An Updated Meta-Analysis. Diagnostics (Basel). 2021 Nov 13;11(11):2095. DOI: 10.3390/diagnostics11112095
 19. Falconer J, Diaconu K, O'May F, Gummaraju A, Victor-Uadiale I, Matragrano J, et al. Cholera diagnosis in human stool and detection in water: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2022 Jul 6;17(7):e0270860. DOI: 10.1371/journal.pone.0270860
 20. Dizon JJ, Fukumi H, Barua D, Valera J, Jayme F, Gomez F, et al. Studies on cholera carriers. Bull World Health Organ. 1967;37(5):737-43.
-
- Информация о соавторах:**
- Королёва-Ушакова Анжела Григорьевна, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- Шевяков Антон Георгиевич, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- Фёдоров Тарас Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- Соловьёв Павел Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- Горбатов Алексей Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- Хомяков Артём Евгеньевич, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат медицинских наук, главный научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
-
- Information about co-authors:**
- Anzhela G. Korolyova-Ushakova, Junior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor
- Anton G. Shevyakov, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor
- Taras V. Fedorov, PhD in Biological Sciences, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor
- Pavel V. Soloviev, PhD in Biological Sciences, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor
- Alexey A. Gorbato, MD, PhD, Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor
- Artyom E. Khomyakov, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor
- Sergey F. Biketov, MD, PhD, Chief Researcher, of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor