

8. 1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays PEI code 6329/10 (Version 1.0, 7th July 2011). Geneva; 2011.
9. Solonin S.A. *Hepatitis E Virus Circulation among Pigs in Russian Federation*: Diss. Moscow; 2010. (in Russian)
10. Girón-Callejas A., Clark G., Irving W.L., McClure C.P. In silico and in vitro interrogation of a widely used HEV RT-qPCR assay for detection of the species Orthohepevirus A. *J. Virol. Methods*. 2015; 214: 25—8.
11. Drobeniuc J., Meng J., Reuter G., Greene-Montfort T., Khudyakova N., Dimitrova Z. et al. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin. Infect. Dis*. 2010; 51(3): e24—7.
12. Bendall R., Ellis V., Ijaz S., Ali R., Dalton H.J. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *Med. Virol*. 2010; 82(5): 799—805.
13. Bystrova T.N., Polyamina A.V., Knyagina O.N. Qualitative and quantitative parameters of epidemic process of hepatitis E virus infection in Central-European region of Russia. *Mir virusnykh gepatitov*. 2010; (1): 9—13. (in Russian)
14. Potemkin I.A., Kyuregyan K.K., Isaeva O.V., Belyakova V.V., Mayorova O.A., Shchibrik E.V. et al. Prevalence of hepatitis E markers in blood donors in different regions of Russian Federation. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2013; 58(4): 26—8. (in Russian)

Received 10.12.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.932-078.33

Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ

ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, г. Ростов-на-Дону

Отработаны оптимальные режимы постановки прямого варианта планшетного иммуноферментного анализа и дот-иммуноанализа с применением моноклональных пероксидазных конъюгатов для экспрессного выявления холерных вибрионов серогрупп O1 и O139 как в стационарных, так и в полевых условиях без приборного обеспечения. Прямой метод ИФА в планшетном варианте сокращает время анализа до 70—80 мин, а в случае дот-ИФА на мембране — до 70—90 мин. Установлено, что при проведении анализа в условиях комнатной температуры (20—25°C) чувствительность методов остается на исходном уровне.

Ключевые слова: холерный вибрион, моноклональные антитела, пероксидазные конъюгаты, прямой твердофазный иммуноферментный анализ, дот-иммуноанализ.

Для цитирования: Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С. Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (5): 303-307. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307

Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretentchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangelskaya I.V., Bursha O.S.

THE IMMUNE-ENZYME TECHNIQUES OF ANALYSIS IN DIAGNOSTIC OF CHOLERA

The Rostov-on-Don research anti-plague institute of Rospotrebnadzor, 344002 Rostov-on-Don, Russia

The optimal conditions of arrangement of direct alternative of flatbed enzyme-linked immunosorbent assay and dot-immunoanalysis with application of monoclonal peroxidase conjugates for express identification of comma bacillus of serogroups O1 and O139 both in hospital and field conditions without device support. The direct technique enzyme-linked immunosorbent assay in flatbed alternative shortens time of analysis up to 70-80 minutes and in case of dot enzyme-linked immunosorbent assay on membrane - up to 70-90 minutes. It is established that in case of analysis in conditions of room temperature (20-25 oC) sensitivity of techniques remains at initial level.

Keywords: *comma bacillus; monoclonal antibodies; peroxidase conjugates; direct solid-phase immunoenzyme analysis; dot-immunoanalysis.*

For citation: Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretentchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangelskaya I.V., Bursha O.S. The immune-enzyme techniques of analysis in diagnostic of cholera. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (5): 303-307. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307

For correspondence: *Evdokimova V.V., research worker of laboratory of hybrids. e-mail: nika-evd@yandex.ru*

Information about authors:

*Alekseeva L.P., alekseeva_lp@antiplague.ru
Kruglikov V.D., kruglikov_vd@antiplague.ru
Arkhangelskaya I.V., arhangelskaya_id@antiplague.ru*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Financing. *The study had no sponsor support*

Received 02.09.2015
Accepted 15.12.2015

Для корреспонденции: Евдокимова Вероника Вячеславовна, науч. сотр. лаборатории гибридов ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, г. Ростов-на-Дону, e-mail: nika-evd@yandex.ru

Перспективным направлением в иммунодиагностике инфекций является использование тест-систем с визуальным учетом результатов, основанных на иммунофильтрации, иммунохроматографии, иммуноагглютинации и дот-иммуноанализе [1]. В качестве основы для изготовления современных иммунологических тест-систем наиболее стандартизованными и универсальными являются панели моноклональных антител (МКА), которые позволяют создавать высокоспецифичные системы детекции холерного вибриона и его факторов вирулентности. Одним из самых чувствительных иммунодиагностических тестов обнаружения холерного вибриона является твердофазный иммуоферментный анализ (ТИФА) и его дот-вариант (ДИА) на нитроцеллюлозной мембране. К настоящему времени в нашей стране и за рубежом разработан целый ряд экспериментальных диагностикумов, предназначенных для выявления холерного вибриона и его антигенов иммуоферментными методами. В институте «Микроб» проводились работы по конструированию иммуоферментных тест-систем с использованием МКА. Так, Н.Е. Терешкиной [2] описано создание на основе разноэпитопных МКА и поликлональных антител к ЛПС *V. cholerae* O139 экспериментальных диагностических иммуоферментных тест-систем, предназначенных для детекции возбудителя холеры независимо от наличия у него капсулы. В работе Н.А. Сыровой [3] показаны преимущества применения высокочувствительных тест-систем для ТИФА (0,3—0,5 мкг/мл), включая дот-иммуноанализ (ДИА: 0,06—0,25 мкг/мл), на основе мышинных МКА к типоспецифическим О-антигенам *V. cholerae* O1, выделенным химическим путем, для контроля их биосинтеза при производстве бивалентной химической вакцины. В публикации В.А. Федоровой и соавт. [4] описано конструирование экспериментальных иммуоферментных тест-систем с использованием МКА к *V. cholerae* O139; их чувствительность составила $2,3 \cdot 10^6$ (непрямой вариант ТИФА) и $1,5 \cdot 10^5$ — $1,2 \cdot 10^6$ (прямой вариант ТИФА) [4]. В Ростовском противочумном институте О.В. Маркина [5] отработала и оптимизировала на основе МКА к холерному токсину иммуоферментный метод двойных антител (ИФА-2АТ), который позволяет оценить токсинпродукцию штаммов холерных вибрионов серогрупп O1 и O139 с чувствительностью метода 50 нг/мл. В институте «Микроб» Е.А. Михеева и соавт. [6] применили МКА для обнаружения холерного токсина в ДИА на ацетатцеллюлозной мембране. Сотрудники ФГУН ГНЦ ПМБ (г. Оболensk) оценили возможность использования в иммунохроматографических тест-системах МКА, продуцируемых гибридомами, полученными в Ростовском противочумном институте. Проведенные исследования показали, что антитела сохраняют свою иммунохимическую активность после конъюгирования с коллоидным золотом, поэтому на их основе были разработаны ИХ-полоски [7, 8]. Однако экспериментальные разработки зачастую не завершаются внедрением результатов в практику на уровне сертифицированных препаратов.

В Ростовском-на-Дону противочумном институте получены экспериментальные серии пероксидазных конъюгатов на основе видоспецифических моноклональных антител (МКА), направленных к эпитопам О-полисахарида холерных вибрионов серогруппы O1 (ПХ-МКА O1) и соответственно серогруппы O139 (ПХ-МКА O139). Моноклональные конъюгаты показали в ТИФА и дот-ИФА высокую чувствительность (порядка 10^5 — 10^6 мкл./мл) и строгую специфичность в отношении штаммов *V. cholerae* O1, *V. cholerae* O139 при отсутствии перекрестных реакций с представителями близкородственных и гетерологичных микроорганизмов [9].

Цель данной работы — подобрать оптимальный режим постановки планшетного прямого ИФА и дот-ИФА с применением моноклональных пероксидазных конъюгатов для экспрессного выявления холерных вибрионов серогрупп O1 и

O139 как в стационарных, так и в полевых условиях без приборного обеспечения.

Материал и методы. Штаммы микроорганизмов. В работе использовали штаммы возбудителя холеры (*V. cholerae* O1 — 5 шт., *V. cholerae* O139 — 5 шт.) и близкородственных микроорганизмов (*E. coli* — 1 шт., *Aeromonas* — 1 шт., *V. cholerae* не O1/не O139 — 1 шт.), полученные из музея Института живых культур. Взвеси холерных вибрионов и гетерологичных культур готовили в 0,9% растворе хлорида натрия (рН 7,2±0,1) по стандартным образцам мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича 10 ед. (ОСО 42-28-85П) соответствующего года выпуска, эквивалентных концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./мл; клетки обеззараживали кипячением в течение 30 мин.

Гибридомы-продуценты. Источником иммуноглобулинов служили культуральные жидкости (КЖ) гибридомы F8G12 (патент № 2425874) [10], продуцирующей МКА к О-антигену *V. cholerae* O1, и гибридомы 3E4 (патент № 2425875) [11], продуцирующей МКА к О-полисахариду *V. cholerae* O139. Гибридомы были выведены из состояния глубокого холода, культивированы при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 70—80% влажности с использованием среды RPMI-1640 (Gibco) с добавлением 15% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Thermo scientific, UK), L-глутамин; МКА были накоплены в препаративных количествах *in vitro*.

Очистка специфических иммуноглобулинов. Выделение иммуноглобулиновой фракции из культуральных жидкостей гибридов осуществляли преципитацией сульфатом аммония [12—14].

Приготовление пероксидазных конъюгатов. Конъюгацию очищенных иммуноглобулинов с пероксидазой хрена (RZ >3, акт >250 ед/мг, хромат. чист, обессол., для иммунолог., ДИА-М) проводили по методу Р.К. Nakane [15] в соотношении 2:1 соответственно.

Имуноферментный анализ. При постановке прямого ТИФА в полистироловых планшетах (Greiner Bio-One, GmbH) бактериальные взвеси готовили в карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9,5). Для отмывки несвязавшихся компонентов использовали фосфатно-солевой буфер с твином (ФСБ-Т). В качестве хромогена использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (AppliChem, Германия). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре BioTek EL*800 (BioTek Instruments, США) при длине волны 450 нм (референс-волна 630 нм).

Дот-иммуноанализ. Для постановки дот-ИФА по стандартной методике [16] использовали нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) с диаметром пор 0,45 мкм (Bio-Rad). Все манипуляции с мембранами проводили с помощью анатомического пинцета, не касаясь ее руками. Обеззараженные кипячением и приготовленные на карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9,5) взвеси холерных вибрионов наносили в объеме 2 мкл на точку. Мембраны высушивали на воздухе, затем трижды промывали в фосфатно-солевом буфере с твином, забивали пустые сайты на мембране 1% раствором БСА (Albumin bovine, Amresco) в течение 30 мин, трижды промывали в ФСБ-Т и инкубировали в рабочем растворе моноклонального пероксидазного конъюгата. Затем трижды промывали мембрану в дистиллированной воде и проявляли специфические пятна хромогеном — диаминобензидином (Aldrich).

Статистическая обработка результатов. Все исследования проводили не менее чем в трех повторностях. При анализе и обобщении результатов планшетного ИФА были использованы методы, описанные И.П. Ашмариним и соавт. [17]. Кроме того, для обработки данных применяли компьютерную программу Statistica: Basic Statistic and Tables.

Результаты и обсуждение. На первом этапе работы сравнивали различные условия сорбции антигена в лунках полистироловых серологических планшет. Сенсibilизацию бактериальных взвесей (по 3 штамма каждой серогруппы)

Таблица 1

Условия сорбции антигена в лунках серологических планшетов

Время сорбции антигена, мин	Температура сорбции антигена			
	комнатная (20—25°C)		37°C	
	показатели ОП для <i>V. cholerae</i> O1	показатели ОП для <i>V. cholerae</i> O139	показатели ОП для <i>V. cholerae</i> O1	показатели ОП для <i>V. cholerae</i> O139
60	2,643±0,025	2,589±0,015	2,720±0,024	2,690±0,018
30	2,496±0,019	2,470±0,018	2,560±0,022	2,520±0,016

Примечание. Представлены средние значения оптических плотностей (ОП) и стандартное отклонение. ОП К = 0,072±0,023.

проводили при комнатной температуре (20—25°C) и при 37°C в течение 30 и 60 мин. Время инкубации антигена с холерным моноклональным пероксидазным конъюгатом (в рабочем разведении) составляло 40 мин. Результаты реакций учитывали визуально и путем определения оптической плотности проб. Результаты считали положительными, если значение D_{450} исследуемого образца в 2 раза и более превосходило значение D_{450} отрицательных контролей. Результаты представлены в табл. 1.

Как видно, значения оптических плотностей при разных температурных режимах и времени сорбции антигена колеблются незначительно. Из этого следует, что для постановки прямого ТИФА достаточно короткого режима сенсibilизации антигена — 30 мин при комнатной температуре.

Далее сравнивали температуру и время инкубации сенсibilизированного антигена с моноклональным пероксидазным конъюгатом (табл. 2).

Из данных табл. 2 следует, что для специфического взаимодействия антигена с моноклональным конъюгатом достаточно 20 мин инкубации при комнатной температуре.

Ранее нами было показано, что чувствительность ТИФА при использовании пероксидазных конъюгатов составляет 10^5 — 10^6 м.кл. [9]. Мы определили минимальную дозу микробных клеток на лунку (сорбция антигена в течение 30 мин в разных температурных условиях), которую будет выявлять пероксидазный конъюгат при его инкубации с антигеном в течение 20 мин (табл. 3).

Таким образом, чувствительность метода остается на уровне 10^6 м.кл при сенсibilизации антигена в течение 30 мин в указанных температурных режимах (37°C и комнатная (20—25°C)) и продолжительности инкубации антигена с пероксидазным конъюгатом 20 мин, из чего следует, что все

Таблица 2

Режимы инкубации антигена с холерным пероксидазным моноклональным конъюгатом

Время инкубации, мин	Температура инкубации			
	комнатная (20—25°C) (показатели ОП после инкубации антигена с конъюгатом)		37°C (показатели ОП после инкубации антигена с конъюгатом)	
	<i>V. cholerae</i> O1 + ПХ-МКАО1	<i>V. cholerae</i> O139 + ПХ-МКАО139	<i>V. cholerae</i> O1 + ПХ-МКАО1	<i>V. cholerae</i> O139 + ПХ-МКАО139
40	2,621±0,017	2,595±0,024	2,701±0,024	2,678±0,014
20	2,583±0,022	2,550±0,018	2,633±0,013	2,610±0,012

Примечание. Представлены средние значения оптических плотностей (ОП) и стандартное отклонение. ОП К 0,074±0,014.

Таблица 3

Чувствительность пероксидазных конъюгатов в ТИФА

Температура сорбции антигена	Чувствительность (минимальное кол-во микробных клеток в лунке)	
	<i>V. cholerae</i> O1 + ПХ-МКАО1	<i>V. cholerae</i> O139 + ПХ-МКАО139
37°C	10^6	10^6
Комнатная (20—25°C)	10^6	10^6

этапы ТИФА можно проводить в условиях комнатной температуры (20—25°C).

В задачи исследования также входил подбор оптимальных режимов постановки дот-иммуноанализа, а именно сравнение различных значений температуры и времени инкубации антигена с экспериментальными препаратами пероксидазных конъюгатов. Сенсibilизацию НЦМ осуществляли так, как описано в *Материалах и методах*: наносили антиген из микробных взвесей следующих концентраций: 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 м.кл./мл. Блокирование свободных сайтов проводили в термостате (37°C) при комнатной температуре (20—25°C) в стационарных условиях и на шейкере в течение 30 мин. Конъюгаты МКА-О1 и МКА-О139 использовали в рабочих разведениях, которые устанавливали в предварительных опытах. Мембрану погружали в раствор конъюгата и выдерживали при разных режимах (комнатная температура — 20 мин, термостат 37°C — 20 мин, шейкер/комнатная температура — 20 мин; комнатная температура — 40 мин, термостат 37°C — 40 мин, шейкер/комнатная температура — 40 мин), затем отмывали. Оценку реакции проводили визуально по интенсивности окрашивания точек-дотов. Результат считали отрицательным, если на месте нанесения антигена пятно не проявляется (может проявляться незначительное фоновое светло-бежевое окрашивание). Результат считали положительным, если на месте нанесения антигена появляется коричневое пятно с четким контуром. При отработке режима постановки дот-ИФА установили, что для специфического связывания сенсibilизированного антигена с пероксидазными конъюгатами 20 мин инкубации недостаточно, а выявление холерных вибрионов возможно только после 40 мин инкубации антигена с мечеными МКА. Однако для выявления *V. cholerae* O1 с помощью моноклонального пероксидазного конъюгата (ПХ-МКА O1) применимы все три варианта 40-минутной инкубации (рис. 1), тогда как для обнаружения штаммов *V. cholerae* O139 оптимальным является вариант инкубации мембран в рабочем растворе пероксидазного конъюгата (ПХ-МКА O139) — 40 мин на шейкере при комнатной температуре (20—25°C) (рис. 2). Вполне допустима постановка реакции в термостате и при комнатной температуре без шейкера, но в этом случае интенсивность специфических пятен будет снижена (возможен вариант периодического покачивания емкости в процессе инкубации мембраны в рабочем растворе конъюгата ПХ-МКА O139). Из представленных результатов следует, что чувствительность метода дот-ИФА остается на уровне $2 \cdot 10^6$ м.кл. на точку для ПХ-МКА O1 при указанных режимах инкубации с антигеном (комнатная температура — 20 мин, термостат 37°C — 20 мин, шейкер/комнатная температура — 20 мин; комнатная температура — 40 мин, термостат 37°C — 40 мин, шейкер/комнатная температура — 40 мин) и для ПХ-МКА O139 при режиме шейкер/комнатная температура — 40 мин.

Таким образом, результаты исследований дают основание говорить о сопоставимой диагностической ценности дот-ИФА и классической иммуноферментной реакции на пластике. Использование МКА для детекции *V. cholerae* в

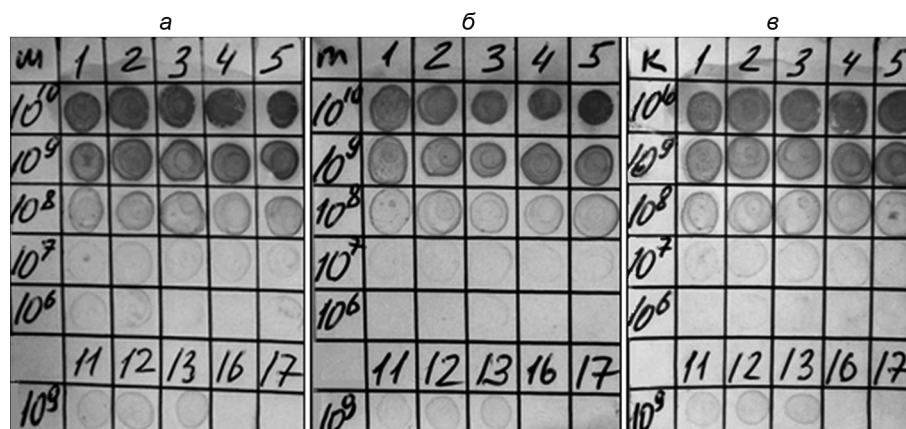


Рис. 1. Дот-ИФА с ПХ-МКА O1:

a — инкубация антигена с пероксидазным конъюгатом в течение 40 мин при комнатной температуре (20—25°C) на шейкере; *б* — инкубация антигена с пероксидазным конъюгатом в течение 40 мин в термостате при 37°C; *в* — инкубация антигена с пероксидазным конъюгатом в течение 40 мин при комнатной температуре (20—25°C). 1—5 — штаммы *V. cholerae* O1: 18895, 18252, 18963, 18512, 18826; 11 — *E. coli*; 12 — *Aeromonas*; 13 — *V. cholerae* не O1/не O139; 16, 17 — штаммы *V. cholerae* O139.

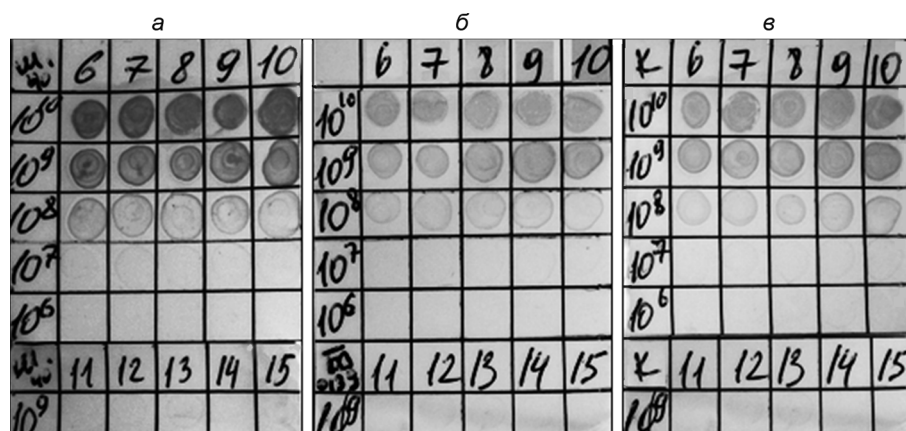


Рис. 2. Дот-ИФА с ПХ-МКА O139:

a — инкубация антигена с пероксидазным конъюгатом в течение 40 мин при комнатной температуре (20—25°C) на шейкере; *б* — инкубация антигена с пероксидазным конъюгатом в течение 40 мин в термостате при 37°C; *в* — инкубация антигена с пероксидазным конъюгатом в течение 40 мин при комнатной температуре (20—25°C). 6—10 — штаммы *V. cholerae* O139: 16485, 16131, 16070, 17916, 16488; 11 — *E. coli*; 12 — *Aeromonas*, 13 — *V. cholerae* не O1/не O139, 14, 15 — штаммы *V. cholerae* O1.

ТИФА и дот-иммуноанализе обеспечивает высокую специфичность методов; применение пероксидазных конъюгатов МКА исключает возможность перекрестных реакций и необходимость использования дорогостоящих антивидовых конъюгатов. Прямой метод ИФА в планшетном варианте сокращает общее время анализа до 70—80 мин, в случае дот-ИФА на мембране — до 70—90 мин. Визуальная оценка анализа, простота и экономичность данных тестов по затратам обуславливают их практическую значимость и возможность применения для диагностики возбудителя холеры в полевых условиях при исследовании большого количества штаммов. На основании полученных результатов можно говорить о перспективности внедрения разработанных препаратов в лабораторную практику как в стационарных, так и в полевых условиях. Преимущества прямых вариантов иммуноферментного анализа позволяют использовать их в качестве альтернативы или в дополнение к другим диагностическим экспресс-тестам детекции холерных вибрионов, а также в научных исследованиях. Кроме того, институт является референс-центром по мониторингу за холерой и, очевидно, что применение высококачественных тест-систем будет

способствовать повышению достоверности серологического анализа.

Продолжение исследований предусматривает широкую апробацию экспериментальных (лиофильно высушенных) образцов моноклональных пероксидазных конъюгатов в процессе мониторинговых исследований на холеру и при поступлении культур в институт на идентификацию.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 14—16 см. REFERENCES)

1. Коллинз У.П. *Новые методы иммуноанализа*. М.: Мир; 1991.
2. Терешкина Н.Е. *Изучение капсульных и бескапсульных форм Vibrio cholerae O139 с использованием поли- и моноклональных антител*. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Саратов; 2004.
3. Сырова Н.А. *Получение, характеристика и биотехнологические аспекты применения поли- и моноклональных антител к антигенам Vibrio cholerae O1 Инаба и Огава*. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Саратов; 2005.

4. Федорова В.А., Терешкина Н.Е., Сырова Н.А. и др. Конструирование экспериментальных иммуноферментных тест-систем с использованием моноклональных антител к *V. cholerae* O139. В кн.: Гинцбург А.Л., ред. *Материалы IX съезда Всероссийской научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов*. М.: Санэпидмедиа; 2007; т. 3: 89.
5. Маркина О.В. *Изучение токсинопродуцирующей способности штаммов *Vibrio cholerae* O1 и *Vibrio cholerae* O139 с помощью иммуноферментного анализа и культуры клеток*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Ставрополь; 2008.
6. Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Терешкина Н.Е. и др. Получение и применение моноклональных антител для обнаружения холерного токсина. В кн.: Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Материалы XI Межгосударственной научно-практической конференции: «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на ЧС в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера»*. Саратов: Приволжское издательство; 2012: 162—4.
7. Алексеева Л.П., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Храмов М.В., Кругликов В.Д., Агафонова В.В. и др. Сравнительная оценка методов дот-иммуноанализа и иммунохроматографии при выявлении холерных вибрионов O1 серогруппы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010; (6): 88—93.
8. Баранова Е.В., Федюкина Г.Н., Соловьев П.В., Колосова Н.В., Миронова Л.В., Куликалова Е.С. и др. Разработка иммунохроматографических тестов для выявления штаммов серогруппы O1 и токсинобразующих штаммов холерного вибриона. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Ростов-на-Дону; 2013; 26: 215—8.
9. Алексеева Л.П., Козлова Г.А., Маркина О.В., Кретенчук О.Ф., Яговкин М.Э., Бурша О.С. Использование моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации холерных вибрионов O1, O139 в реакции дот-иммуноанализа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; (3): 26—9.
10. Алексеева Л.П., Евдокимова В.В., Фатеева О.Ф. *Штамм культивируемых гибридных клеток животных *Mus. Musculus L* — продуцент моноклональных антител, специфичных к о-антигену холерных вибрионов O1 серогруппы*. Патент РФ № 2425874; 2011.
11. Алексеева Л.П., Маркина О.В., Фатеева О.Ф., Яговкин М.Э. *Штамм культивируемых гибридных клеток животных *Mus. Musculus L* — продуцент моноклональных антител, специфичных к ЛПС холерных вибрионов O139 серогруппы*. Патент РФ №2425875; 2011.
12. Кэтти Д., ред. *Антитела: Методы*. Книга 1. М.: Мир; 1991.
13. Фримель Г., ред. *Иммунологические методы*. М.: Медицина; 1987.
14. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Ленинград: Медгиз; 1962.
15. Markina O.V. *Study of the Toxin-Producing Ability of *Vibrio Cholerae* O1 and *Vibrio Cholerae* O139 Strains with the Use of Immunoenzyme Assay and Cell Culture*: Diss. Stavropol'; 2008. (in Russian)
16. Mikheeva E.A., Devdariani Z.L., Tereshkina N.E. Production and use of monoclonal antibodies for cholera toxin detection. In: Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., eds. *Proceedings of the XI International Scientific and Practical Conferenc: «Present Day Technologies in the Advancement of Preventive and Response Measures in Case of Emergency Situation of Sanitary-Epidemiological Nature in the Sphere of Public Health» [Materialy XI Mezhgosudarstvennoy nauchno-prakticheskoy konferentsii: «Sovremennye tekhnologii v sovershenstvovanii mer preduprezhdeniya i otvetnykh deystviy na ChS v oblasti obshchestvennogo zdravookhraneniya sanitarno-epidemiologicheskogo kharaktera»]*. Saratov: Privolzhskoe izdatel'stvo; 2012: 162—4. (in Russian)
17. Alekseeva L.P., Telesmanich N.R., Lomov Yu.M., Khramov M.V., Kruglikov V.D., Agafonova V.V. et al. Comparative evaluation of dot-immunoassay and immunochromatographic methods in detection of *Vibrio cholerae* O1 serogroup. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2010; (6): 88—93. (in Russian)
18. Baranova E.V., Fedyukina G.N., Solov'ev P.V., Kolosova N.V., Mironova L.V., Kulikalova E.S. et al. The development of immunochromatographic tests for the detection of O1 and toxin-forming *Vibrio cholerae* strains. In: *«Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans»: The Commission on Scientific Problem [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony»]*. Rostov-na-Donu; 2013; Issue 26: 215—8. (in Russian)
19. Alekseeva L.P., Kozlova G.A., Markina O.V., Kretenchuk O.F., Yagovkin M.E., Bursha O.S. The use of monoclonal peroxidase conjugates for identification of *Vibrio cholerae* O1, O139 in the reaction of dot-immunoassay. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; (3): 26—9. (in Russian)
20. Alekseeva L.P., Evdokimova V.V., Fateeva O.F. *Cultivated Hybrid Cell Strain of *Mus Musculus L* Animals — Producer of Monoclonal Antibodies Specific to O-antigene of Cholera *Vibrio* Serogroup O1*. Patent RF № 2425874; 2011. (in Russian)
21. Alekseeva L.P., Markina O.V., Fateeva O.F., Yagovkin M.E. *Cultivated Hybrid Cell Strain of *Mus Musculus L* Animals — Producer of Monoclonal Antibodies Specific to LPS of Cholera *Vibrio* Serogroup O139*. Patent RF № 2425875; 2011. (in Russian)
22. Catty D., ed. *Antibodies: a Practical Approach, Vol. I*. IRL Press, Oxford; 1988.
23. Friemel H., hrsg. *Immunologische Arbeitsmethoden*. Rostock: Bereich Medizin der Wilhelm-Pieck-Universit@t Rostock; 1984. (in German)
24. Reik L.M., Maines S.L., Ryan D.E., Levin W., Bandiera S. Thomas P.E. A simple non-chromatographic purification procedure for monoclonal antibodies. Isolation of monoclonal antibodies against cytochrome P450 isozymes. *J. Immunol. Methods*. 1987; 100(1—2): 123—30.
25. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12): 1084—91.
26. Bode L., Beutin L., Köhler H. Nitrocellulose-enzyme-linked immunosorbent assay (NC ELISA) — a sensitive technique for the rapid visual detection of both viral antigens and antibodies. *J. Virol. Methods*. 1984; 8(1—2): 111—21.
27. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in the Microbiological Researches [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad: Medgiz; 1962. (in Russian)

Поступила 02.09.15

REFERENCES

1. Kollinz W.P. *New methods for immunoassay*. London; 1987.
2. Tereshkina N.E. *Study of Capsular and Non-Capsular *Vibrio Cholerae* O139 Forms with the Use of Poly- and Monoclonal Antibodies*: Diss. Saratov; 2004. (in Russian)
3. Syrova N.A. *Production, Characterization and Biotechnological Aspects of Usage of Poly- and Monoclonal Antibodies to Antigens of *Vibrio Cholerae* O1 Inaba and Ogawa*: Diss. Saratov; 2005. (in Russian)
4. Fedorova V.A., Tereshkina N.E., Syrova N.A. et al. Construction of experimental immunoenzymatic test-systems with the use of monoclonal antibodies to *V. cholerae* O139. In: Gintsburg A.L., ed. *Proceedings of the IX Congress of All-Russia Scientific-Practical Soci-*

Received 02.09.15