

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека
ФКУЗ «Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»**

На правах рукописи

МИХЕЕВА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ
ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ
ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА**

03.02.03 - микробиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

З.Л. Девдариани

Саратов 2017

СОДЕРЖАНИЕ

| | Стр. |
|--|------|
| ВВЕДЕНИЕ | 6 |
| ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | |
| Глава 1 Методы определения токсинов патогенных бактерий | 13 |
| СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ | |
| Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 29 |
| 2.1 Объекты исследования | 29 |
| 2.1.1 Штаммы микроорганизмов | 29 |
| 2.1.2 Антигены | 29 |
| 2.1.3 Реактивы, питательные среды | 33 |
| 2.1.4 Растворы | 35 |
| 2.1.4.1 Насыщенный раствор сернокислого аммония | 35 |
| 2.1.4.2 0,2 М карбонат-бикарбонатный буфер pH 9,0±0,5 | 35 |
| 2.1.4.3 Натрий-ацетатный буфер 0,001 моль/л pH 4,2±0,2 | 35 |
| 2.1.4.4 Цитратный буферный раствор 0,05 моль/л pH 4,2±0,2 | 35 |
| 2.1.4.5 Буферы для электрофореза | 35 |
| 2.1.5 Клеточные линии | 35 |
| 2.1.6 Лабораторные животные | 36 |
| 2.2 Микробиологические методы | 36 |
| 2.2.1 Культивирование микроорганизмов | 36 |
| 2.2.2 Культивирование холерных вибрионов для индукции холерного токсина в соответствии с рекомендациями CDC | 37 |
| 2.2.3 Подготовка проб | 37 |
| 2.2.3.1 Приготовление бактериальных взвесей | 37 |
| 2.2.3.2 Подготовка проб биологического материала, искусственно контаминированного возбудителем холеры и гетерологичными микроорганизмами | 37 |
| 2.3 Метод получения антителопродуцирующих гибридом | 38 |
| 2.3.1 Гибридизация | 38 |
| 2.3.2 Клонирование гибридом | 39 |

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 2.3.3 | Получение иммуноасцитических жидкостей, содержащих МКА | 39 |
| 2.3.4 | Криоконсервация гибридом | 40 |
| 2.4 | Методы по получению и характеристике иммуноглобулинов | 40 |
| 2.4.1 | Выделение иммуноглобулинов | 40 |
| 2.4.2 | Электрофорез в полиакриламидном геле | 41 |
| 2.4.3 | Определение концентрации белка | 41 |
| 2.4.4 | Изотипирование иммуноглобулинов | 42 |
| 2.4.5 | Определение константы аффинности | 42 |
| 2.4.6 | Определение индекса аддитивности (эпитопный анализ) | 42 |
| 2.4.7 | Получение конъюгата иммуноглобулинов с пероксидазой хрена | 43 |
| 2.5 | Методы иммуноанализа | 43 |
| 2.5.1 | Непрямой вариант ИФА | 43 |
| 2.5.2 | Прямой вариант ИФА | 44 |
| 2.5.3 | «Сэндвич»-вариант ИФА | 45 |
| 2.5.4 | Определение ХТ методом ELISE-GM1 | 45 |
| 2.6 | Статистическая обработка полученных данных | 46 |
| Глава 3 | Получение моноклональных антител, специфичных к холерному токсину | 47 |
| 3.1 | Разработка эффективной схемы иммунного ответа для синтеза мышинных холерных антитоксических антител | 47 |
| 3.2 | Оптимизация процедуры гибридизации миеломных клеток и спленоцитов гипериммунных сингенных мышей | 49 |
| 3.3 | Создание клонотeki стабильных антителопродуцирующих гибридом | 51 |
| 3.4 | Характеристика полученных моноклональных антител | 53 |
| Глава 4 | Разработка комплексного методического подхода для идентификации токсигенных штаммов холерного вибриона | 58 |
| 4.1 | Разработка сэндвич-варианта ИФА с применением МКА для определения холерного токсина | 58 |
| 4.2 | Усовершенствование схемы культивирования токсигенных штаммов <i>V. cholerae</i> | 64 |
| Глава 5 | Конструирование моноклональной иммуноферментной тест-системы для идентификации токсигенных штаммов холерного | 70 |

| | |
|---|----|
| вибриона и определение ее диагностической ценности | |
| 5.1 Комплектация иммуноферментной тест-системы, учет результатов | 70 |
| 5.2 Оценка чувствительности и специфичности созданной тест-системы в рамках лабораторных испытаний | 76 |
| 5.3 Результаты клинических испытаний | 78 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 86 |
| ВЫВОДЫ | 92 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ | 93 |

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|------|---|
| ДМСО | диметилсульфоксид |
| ИФА | иммуноферментный анализ |
| МИ | медицинское изделие |
| МКА | моноклональные антитела |
| ОП | оптическая плотность |
| ПАФ | полный адъювант Фрейнда |
| ПЭГ | полиэтиленгликоль |
| ТИФА | твердофазный иммуноферментный анализ |
| ФСБ | фосфатно-солевой буфер |
| ХТ | холерный токсин |
| ABTS | 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат) |
| НАТ | гипоксантин-аминоптерин-тимидин |
| НТ | гипоксантин, тимидин |
| Ig | иммуноглобулин |
| LT | термолабильный токсин <i>E. coli</i> |
| SDS | додецилсульфат натрия |
| * | пероксидазная метка |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

На основании анализа эпидемиологической обстановки по холере в мире, странах СНГ и России прогноз по этой инфекции на ближайшие годы остается неблагоприятным. Это связано, прежде всего, с существующей реальной возможностью завоза инфекции из эндемичных по холере стран [45, 46, 47, 56, 57, 72].

Холерный токсин (ХТ) занимает ведущее место в патогенезе холеры, являясь основным фактором развития двух ключевых этапов инфекционного процесса – колонизации холерными вибрионами тонкого кишечника и развития профузной диареи. Поэтому для проведения противоэпидемических мероприятий важно определить в кратчайшие сроки токсигенные, эпидемически значимые варианты *Vibrio cholerae* в том числе с использованием методов, направленных на обнаружение холерного энтеротоксина [57, 100, 115, 139].

Согласно принятой схеме лабораторной диагностики холеры заключение о токсигенности и эпидемической значимости *V.cholerae* основывается на результатах определения гемолитической активности в пробе Грейга, изучении чувствительности к диагностическим холерным бактериофагам, а также на основании данных биологической пробы на крольчатах-сосунках и выявления *ctxAB* и *tcpA* генов методом полимеразной цепной реакции [41, 62]. Проба Грейга и определение чувствительности к фагам дают ориентировочную оценку эпидемической значимости. Биологическая модель наиболее объективный, но трудоемкий и продолжительный по времени способ, а определение генов, кодирующих синтез энтеротоксина, не всегда указывает на наличие экспрессии самого токсина. Обнаружение токсинов в лабораторных условиях осуществляют не только с помощью биологических тестов на животных и клеточных перевиваемых культур, но и с использованием различных вариантов иммунофлуоресцентного и иммуноферментного анализов, иммунопреципитации, а также мультиплексных иммуно- и генодиагностических тест-систем.

В настоящее время иммунологические методы диагностики холеры используются как в рамках бактериологического исследования (ускоренные методы обнаружения возбудителя и идентификация культур), так и самостоятельно – для индикации *V.cholerae* в материале, зараженном этим возбудителем [41, 139].

Поскольку концентрация холерного энтеротоксина, вызывающего клинический симптомокомплекс, незначительна наиболее перспективным подходом в данном направлении является определение его продукции с помощью обладающего высокой чувствительностью иммуноферментного анализа (ИФА) [177]. Лабораториями ВОЗ и CDC предложена методика проведения такого анализа с использованием GM1-ганглиозидов [101]. Все это указывает на актуальность работ по созданию препаратов для выявления *V.cholerae* эпидемически значимых по продукции ими ХТ с помощью ИФА.

Выпускаемые в России холерные диагностические иммуноглобулиновые препараты, имеющие государственную регистрацию, основаны на применении поликлональных антител, однако, биотехнологические особенности их приготовления имеют ряд недостатков, связанных со снижением активности после проведения адсорбции, с определенным количеством фоновых неспецифических реакций при использовании адсорбированных диагностических иммуноглобулинов в высокочувствительных цитометрических методах анализа, с высокими экономическими затратами по содержанию животных - продуцентов антител и т.д.

Были предприняты ряд удачных попыток конструирования экспериментальных иммунодиагностических препаратов для определения токсигенных штаммов холерных вибрионов [4, 20], однако, до практического применения они так и не были доведены. Таким образом, вопрос о научно-технологической разработке и внедрении в практику иммуноферментной моноклональной диагностической тест-системы для определения холерного токсина остается открытым.

Цель работы – разработка и оценка диагностической эффективности моноклональной иммуноферментной тест-системы для выявления эпидемически значимых штаммов *V.cholerae*.

Задачи исследования:

1. Получить и охарактеризовать стабильные гибридные клеточные линии, продуцирующие моноклональные антитела к холерному токсину.
2. Выделить и изучить свойства холерных мышинных моноклональных антитоксических антител.
3. Определить чувствительность и специфичность полученных моноклональных антител в ИФА при исследовании препаратов токсина.

4. Подобрать более экономичные условия культивирования токсигенных штаммов *V.cholerae* при сохранении продукции ими не менее 100 нг/мл холерного токсина с разработкой дополнительных мер снижения биологической опасности процесса.

5. Оценить эффективность пробоподготовки и иммуноферментного анализа с использованием разноэпитопных моноклональных антител для определения холерного токсина в биологическом материале, искусственно инфицированном токсигенными штаммами холерных вибрионов.

6. Разработать моноклональную иммуноферментную тест-систему для определения токсигенных штаммов *V.cholerae* классического, эльтор биоваров и оценить ее диагностическую значимость в регламентированных испытаниях.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

Созданы гибридомы 2Е5 и 3Е5, стабильно продуцирующие моноклональные антитела к холерному энтеротоксину, пригодные для конструирования диагностического препарата и его серийного изготовления. Получены патенты на «Штамм гибридных культивированных клеток животных *Mus musculus* ХТ 2Е5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 1 к В-субъединице холерного токсина» (№2583306 опубл. 10.05.2016 г. бюл.№13) на «Штамм гибридных культивированных клеток животных *Mus musculus* ХТ 3Е5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 2А к В-субъединице холерного токсина» (№2590587 опубл. 10.07.2016 г. бюл.№19).

Разработана и адаптирована к серийному изготовлению универсальная отечественная моноклональная иммуноферментная тест-система, способная выявлять с чувствительностью 0,1 нг/мл холерный токсин как I-ого типа, продуцируемый классическим биоваром *V.cholerae*, так и II-ого типа, продуцируемый биоваром эльтор *V.cholerae*.

Усовершенствован способ культивирования токсигенных штаммов *V.cholerae*, обеспечивающий пониженную биологическую опасность процесса и высокую продукцию холерного токсина в концентрации не менее 100 нг/мл.

Оформлена заявка № 2016109320 (приоритет 15.03.2016 г.) на изобретение «Способ выявления эпидемически значимых штаммов *V.cholerae* по продукции холерного токсина методом ИФА и набор для его осуществления».

Новыми являются сведения о возможности использования разработанной холерной диагностической тест-системы моноклональной не только для идентификации чистых культур токсигенных штаммов *V.cholerae*, но и индикации контаминированного ими биологического материала.

Практическая значимость работы

Получены клеточные линии гибридом 2E5, 3E5 и 1D5, 3D3, 3C4, стабильно продуцирующие МКА соответственно к ХТ и ХТ/ЛТ. Проведены межлабораторные испытания с целью определения основных свойств полученных клонов гибридных клеток и оценки перспективности их дальнейшего использования (акт комиссионных испытаний № 210 от 02.12.2013 г. утвержден директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора).

Депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (ФБУН ГНЦ ПМБ п. Оболенск): штамм гибридомы ХТ 2E5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 1 к В-субъединице холерного токсина и штамм гибридомы ХТ 3E5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 2a к В-субъединице холерного токсина (свидетельства о депонировании №№ 196 и 197 от 01.10.2014 г.).

Разработаны методические рекомендации «Способ определения продукции холерного токсина в иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител», одобренные Ученым советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 6 от 08.12.2015 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Изготовлены экспериментальные серии «Тест-системы иммуноферментной для определения токсигенных штаммов холерных вибрионов по продукции холерного токсина моноклональной» и проведены межлабораторные испытания их диагностической ценности (акт комиссионных испытаний № 115-П от 20.06.2014 г. утвержден директором РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора).

Подготовлены и утверждены нормативно-методические документы на «Тест-систему иммуноферментную для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)»: ТУ 9388-052-01898109-2015 от 05.11.2015 г. и инструкция по применению от 01.07.2016 г.

Проведены технические испытания «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» (акт оценки результатов технических испытаний № 05-28/15 от 29.05.2015 г.).

Проведены клинические испытания «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» (акт клинических испытаний № ВМ-пр-06-14/16-КИ от 03.10.2016 г.).

Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения выдано регистрационное удостоверение на медицинское изделие «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФА ХолХТ-М)» от 15.11.2016 г., № РЗН 2016/5013, которое приказом Росздравнадзора от 15.11.2016 г. № 12672 допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Методология и методы исследования.

В работе использовались различные методы исследования: микробиологические (культивирование штаммов микроорганизмов), гибридная технология, методы иммунохимии (ИФА), биохимические и микроскопические.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Гибридомы 2Е5 и 3Е5, полученные с помощью иммунологической инженерии, стабильно продуцируют моноклональные антитела к холерному энтеротоксину в течение IX пассажей на сингенных линейных мышах BALB/c с сохранением исходной активности.

2. Моноклональные антитела 2Е5, 3Е5 в иммуноферментном анализе выявляют холерный токсин при исследовании чистых культур *V.cholerae* и контаминированного биологического материала в концентрации не менее чем 0,1 нг/мл.

3. Моноклональные антитела 2Е5, 3Е5 специфически реагируют только с холерным токсином. Моноклональные антитела 1D5, 3D3, 3C4 обладают перекрестной реактивностью, взаимодействуя, кроме холерного с термолabileм токсином *E.coli*.

4. Усовершенствованный способ культивирования токсигенных штаммов *V.cholerae* позволяет снизить уровень биологической опасности процесса за счет существенного уменьшения объема выращиваемого патогена и исключения постоянного встряхивания, а также сократить сроки пробоподготовки материала для исследования и количество используемой при этом питательной среды.

5. Иммуноферментная диагностическая тест-система на основе разноэпитопных моноклональных антител с высокой чувствительностью и специфичностью выявляет токсигенные штаммы *V.cholerae* при исследовании чистых культур патогена и в биологическом материале.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах. Результаты экспериментальных исследований обработаны с использованием методов статистического анализа. Работа выполнена на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании.

Материалы диссертации представлены на ежегодных научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2009, 2010, 2012, 2014 гг.); Проблемной комиссии Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации «Холера и патогенные для человека вибрионы» (Ростов-на-Дону, 2009 г.); II, VI и VII Ежегодных Всероссийских Конгрессах по инфекционным болезням (Москва, 2010, 2014, 2015 гг.); XI Межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» (Саратов, 2012 г.); Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии в противозидемической защите населения» (Нижний-Новгород, 2014 г.).

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, 4 из них в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ и 2 патента на изобретение №2583306 опубл. 10.05.2016 г. бюл.№13 и №2590587 опубл. 10.07.2016 г. бюл.№19.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования

Работа выполнена в отделе диагностики инфекционных болезней ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в рамках плановых научно-исследовательских тем: «Получение мышинных монорецепторных поликлональных и моноклональных антител и разработка на их основе препаратов для иммунодиагностики бактериальных особо опасных инфекций» 2008-2012 гг. (шифр темы 30-2-08, № гос.регистрации 0120.0804520), «Усовершенствование и разработка иммуноферментных тест-систем для лабораторной диагностики чумы и холеры» 2013-2016 гг. (шифр 42-2-13, № гос.регистрации 0120.1354365).

Основные разделы диссертационной работы, написание статей, оформление патентов выполнены лично Михеевой Е.А. на базе лабораторий иммунодиагностики и молекулярной диагностики ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Клинические испытания (глава 5.3) проведены совместно с сотрудниками клинико-диагностической лаборатории ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» (г. Москва).

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 112 страницах компьютерного текста и состоит из перечня сокращений, введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 1 рисунком и 27 таблицами. Библиография включает 205 источников литературы, в том числе 75 отечественных.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Методы определения токсинов патогенных бактерий

К основным современным источникам биологической опасности, создающим наибольшую угрозу населению, относят патогенные микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности [179]. Токсические продукты микроорганизмов, представляющие собой секретируемые микробные протеины, как правило, энзимы, обладают высокой активностью и чрезвычайно токсичны для человека в низких концентрациях.

Для идентификации и анализа как самих токсинов, так и организмов, которые их вырабатывают, в настоящее время используются различные лабораторные методы, включающие биологические, иммунологические, иммунохимические, биохимические, генодиагностические и ряд других методов [101, 102, 103, 172].

Традиционным для детекции токсинов является биологический метод, который заключается в регистрации их патогенного действия на одноклеточные организмы, культуры клеток, куриные эмбрионы, а также на лабораторные животные. Для воспроизведения последнего из перечисленных выше способов диагностики, как правило, используют несколько (группу) животных. Его техническое выполнение трудоемко, сопряжено с большими временными (до нескольких суток), а также экономическими затратами по уходу и содержанию лабораторных животных. Кроме того, лаборатория должна иметь специальное разрешение на проведение такого рода работ.

Различные варианты наиболее доступных и эффективных иммунологических методов исследования использовались как на заре обнаружения бактериальных токсинов, так и в настоящее время. К ним относятся иммунодиффузионная преципитация, реакция гемагглютинации, коагглютинации, латекс-агглютинации и некоторые другие. Ключевыми взаимодействующими субстанциями этих реакций являются специфические антигены и антитела [30].

Существуют различные модификации иммунодиффузионной преципитации, но суть ее заключается в том, что при одновременной диффузии в геле растворимых антигенов и антител образуются полосы преципитации в зоне их оптимального соотношения – точке эквивалентности [32]. Чувствительность метода находится в диапазоне 0,01-0,1 мг/мл. Интерпретация полученных результатов порой затруднена, так

как, если концентрация токсина в исследуемом образце слишком высока, требуется дополнительное титрование (разведение) испытуемого образца для оптимального соотношения антиген-антитело, приводящее к образованию зоны или линии специфической преципитации. Возможны атипичные неспецифические реакции [84]. Одним из вариантов иммунодиффузионной преципитации является электроиммунодиффузия, которая, в частности, была использована для количественного определения стафилококкового энтеротоксина за счет проникновения токсина в агарозный гель под действием электрического тока с последующим определением его количества [120, 147].

Учитывая, что при идентификации возбудителя кишечной палочки наиболее важным является определение наличия термостабильного и термолабильного энтеротоксинов (ST и LT), была разработана технология определения токсигенности *E.coli*, в основе которой лежит процесс встречной иммунодиффузии энтеротоксинов с антителами гипериммунной анитоксической сыворотки крови кролика к высокоспецифичным конъюгатам ST/LT-энтеротоксинов. В местах оптимального количественного соотношения энтеротоксинов и антитоксинов, нанесенных на фильтровальную бумагу, происходит их взаимодействие с образованием преципитата в виде белой линии [37, 69].

Гемагглютинация является более чувствительным методом определения токсина, чем геллимунодиффузия. Она происходит путем склеивания и выпадения в осадок взвешенных в жидкости эритроцитов под воздействием различных агентов, например, антител, токсинов бактерий или вирусов. Различают активную и пассивную (непрямую) гемагглютинацию. Активная гемагглютинация применяется для определения активности вирусов или титра вируснейтрализующих антител, а также широко используется для определения групповой принадлежности крови. Пассивная гемагглютинация происходит под влиянием антител адсорбированных на эритроцитах барана при наличии токсина в исследуемом образце [135].

Принцип реакции коагглютинации заключается в том, что белок А золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* (штамм Cowan 1) обладает способностью соединяться с Fc-фрагментом IgG человека и ряда млекопитающих, в том числе лабораторных животных-продуцентов гипериммунных диагностических сывороток. При этом Fab-фрагменты антител остаются свободными и взаимодействуют с

гомологичными антигенами. Наличие токсина в образце можно обнаружить через 10 минут [94]. Существуют коммерческие версии коаггулинирующих тест-систем для определения энтеротоксигенных штаммов кишечной палочки (Karo Bio Diagnostics AB, Huddinge, Sweden).

Варианты реакции латексной агглютинации отличаются от гемагглютинации тем, что носителем антител, взаимодействующим с растворимым антигеном, являются латексные частицы. Результат учитывается визуально по степени агглютинации. Являясь простым и быстрым в выполнении анализом, он дает лишь полуколичественный результат. Для диагностики бактериальных токсинов производятся латексные наборы, позволяющие выявить токсины *Clostridium perfringens* [80], *Bacillus cereus* [124], *S.aureus* [201], *E.coli* [184].

Исторически первым среди иммунохимических методов был радиоиммунологический анализ (РИА), предложенный в конце 50-х годов прошлого века. Благодаря возможности определять метку, которой являлся изотоп йода (I-125 и I-131), в очень малых концентрациях удалось достигнуть высокой чувствительности анализа (на уровне пкг/мл). Принцип РИА основан на выявлении комплекса антиген-антитело, в котором один из иммунореагентов мечен радиоактивным изотопом. Учет реакции проводят по убыванию или по возрастанию радиоактивности (в зависимости от методики РИА) с помощью специальных счетчиков ионизирующего излучения [149]. Метод высокочувствителен, но уже фактически вытеснен иммуноферментным анализом, как более безопасным и технически простым при постановке и учете результатов.

На протяжении последних десятилетий иммуноферментные методы анализа интенсивно развивались в теоретическом и практическом плане и к настоящему времени сформировались в самостоятельное научное направление, имеющее важное прикладное значение [198].

Чаще всего на практике используются три вида твердофазного иммуноферментного анализа – непрямой, прямой и «сэндвич»-вариант. В непрямом варианте иммуноферментного анализа на первой стадии на поверхность лунок полистирольного планшета сорбируется антиген. После удаления несвязавшихся молекул антигена добавляется образец, содержащий специфичные к данному антигену антитела. Образовавшиеся комплексы антиген-антитело детектируются с помощью

антивидовых антител, конъюгированных с какой-либо меткой. В прямом варианте детекция сорбированного антигена осуществляется непосредственно с помощью специфичных антител, конъюгированных с меткой. В «сэндвич»-варианте на первой стадии на поверхность планшета сорбируется не антиген, а антитела, специфичные к исследуемому антигену. После удаления несвязавшихся молекул антител добавляется образец, содержащий антиген. Для детекции образовавшегося комплекса антитело-антиген добавляются вторые антитела меченые ферментом. Использование в «сэндвич»-варианте ИФА антител, специфичных к двум различным эпитопам антигена, позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности при определении антигена. Известны коммерческие препараты твердофазного иммуноферментного анализа, чувствительность которого находится в пределах 0,01-1 нг вещества в 1 мл исследуемого раствора, например, в случае рицина и стафилококкового энтеротоксина В, а также дифтерийного токсина [111, 168, 169].

Иммунофлюоресцентный анализ, или реакция иммунофлюоресценции, также основан на взаимодействии антигенов с антителами, но иммунореагент при этом помечен красителем, светящимся в ультрафиолетовых лучах.

Метод позволяет детально анализировать биологические образцы на присутствие антигенных детерминант, характерных для определенных возбудителей, вызывающих заболевание, проводить количественную оценку как поверхностных, так и внутриклеточных белков и рецепторов. Исследование и оценка может выполняться вручную при помощи флюоресцентного микроскопа или автоматизировано с использованием проточного цитометра или микрочипового цитометра. Возможно применение конфокального микроскопа и роботизированного флюоресцентного микроскопа (в том числе совмещенных с проточным цитометром) в сочетании с программной системой обработки изображений. Имеющиеся в настоящее время автоматизированные технологии позволяют анализировать в одном образце примерно 50 различных антигенов с использованием набора различных флюоресцентных маркеров в формате высокоинформативной микроскопии и цитометрии и примерно вдвое меньшим максимальным набором антигенов с использованием современной проточной цитометрии или конфокальной микроскопии. Основными практическими приложениями этих методов являются онкология, клеточная биология, генетика, фармакология, микробиология и др. При определении нескольких токсинов в

значительном количестве опытных образцов, используются методы мультиплексного анализа. К их числу относятся 2-х мерные и 3-х мерные биочипы, позволяющие проводить параллельное определение нескольких токсинов на одной поверхности и мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ, сочетающий проточную флуориметрию и иммунохимический «сэндвич»-вариант ИФА на основе моноклональных антител. Именно этот метод позволяет проводить одновременную детекцию различных токсинов (исчисляемых десятками) в одной анализируемой пробе. Так Петрова Е.Э. с соавт. [60] описали «сэндвич»-вариант иммуноэнзимного анализа и биплексного иммунофлуоресцентного анализа с применением технологии xMAP (Luminex) для количественного определения холерного токсина и термолабильного токсина *E.coli*.

В последние годы все более широкое применение в микробиологии и эпидемиологии находят генодиагностические методы. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) впервые была описана в середине 1980-х годов [159] и является высоко специфичным и чувствительным методом диагностики. В последующем ПЦР была усовершенствована Arnheim N. *et al.* [77] и Wolcott M.J. *et al.* [203]. Однако, несмотря на высокую чувствительность и специфичность она имеет ряд недостатков, к наиболее значительным из которых следует отнести необходимость использования дорогостоящего оборудования, реактивов и особой организации помещений для проведения анализа, что ограничивает возможность использования ПЦР в полевых условиях и в плохо оснащенных лабораториях. Кроме того, в пробах из внешней среды и образцах стула нехолерных больных иногда содержатся примеси, ингибирующие полимеразную цепную реакцию [1, 139].

Новым подходом к идентификации токсинов является масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации, позволяющая успешно анализировать термолабильные нелетучие соединения, к которым относится большинство природных токсинов, а появление биоинформационных баз данных значительно облегчает идентификацию токсинов белковой природы. Масс-спектрометрическая идентификация пептидных токсинов более надежна, чем общепринятые иммунологические методы, недостатком которых является возможность появления ложноположительных и ложноотрицательных ответов. Несмотря на то, что некоторые белки отсутствуют в базах данных, используемый метод сравнения аминокислотных последовательностей, определенных в

ходе исследования (например, тандемный MS-MS-анализ), с последовательностями уже определенных белков (MS BLAST) позволит, если не идентифицировать белки, то хотя бы их обнаружить. Масс-спектрометрические методы все чаще применяются в последние годы для определения структуры и идентификации токсинов [86, 161, 162].

Несмотря на то, что до сих пор в качестве основных приборных комплексов для анализа пептидных токсинов используют масс-спектрометры с источником ионов “электроспрей” в сочетании с жидкостным хроматографом, метод MALDI-масс-спектрометрии находит свое применение, особенно в тех случаях, когда количество токсина, выделенного из биологического образца, чрезвычайно мало. Кроме того, как уже упоминалось, идентификация белков, выделенных из двумерного геля, возможна только с помощью метода MALDI-MS.

В последние годы MALDI-TOF масс-спектрометрия зарекомендовала себя как высоконадежный метод идентификации микроорганизмов [39, 160]. В основе метода лежит получение масс-спектра рибосомальных белков исследуемого микроорганизма, являющихся высоко консервативными и видоспецифичными, и сравнение его с масс-спектрами, содержащимися в базе данных. Выраженная в относительных единицах (Score) степень сходства позволяет сделать вывод о принадлежности микроорганизма к тому или иному виду. Обычно объектом масс-спектрометрического исследования является материал чистой культуры микроорганизма, выращенного на твердой питательной среде, однако, возможна идентификация микробного агента в жидких питательных средах, а также в биологических жидкостях [117, 170].

К наиболее опасным бактериальным токсинам относят ботулиновый, столбнячный, дифтерийный, стафилококковые, стрептококковый, токсины пищевых токсикоинфекций, сибиреязвенный, холерный.

При заражении ботулизмом решающее значение имеет лабораторная диагностика по обнаружению ботулинового токсина в крови больных, рвотных массах, промывных водах желудка, моче, кале, а так же в продуктах питания, употребление которых могло привести к отравлению.

Clostridium botulinum - возбудитель ботулизма, вырабатывает 8 типов ботулинического токсина (A, B, C1, C2, D, E, F, G). Но только 5 из них токсичны для человека (A, B, E, F, G). Самый токсичный тип A, типы C и D токсичны для животных и птиц [54].

Для определения типа ботулинического токсина используют специфическую реакцию нейтрализации на белых мышах [34, 38, 55, 63]. Чувствительность данного метода составляет 30-40 пг/мл ботулотоксина [66, 97, 200]. Летальная доза для 50 % мышей составляет 5-10 пг [183].

Постановка реакции нейтрализации с определением типа ботулотоксина имеет важное значение при выборе нужной сыворотки для специфического лечения ботулизма [34, 38, 55]. Поэтому при выдаче ответа об обнаружении ботулинового токсина лаборатория должна обязательно указывать его тип. Высокая чувствительность биологического теста ограничена сроком выполнения – 6 дней. Кроме этого, биологический вариант лабораторной диагностики сопряжен с экономическими затратами, необходимостью проведения работы в специализированной лаборатории, этическими моментами, связанными с проведением опытов над животными. Поэтому до сих пор остается актуальным вопрос об альтернативном методе определения токсинов *C.botulinum*.

Серотип токсина лучше определять с помощью реакции непрямой гемагглютинации с сенсibilизированными анитоксическими сыворотками [51, 53]. Она специфична, чувствительна, значительно экономичнее, быстрее дает результат, чем реакция нейтрализации *in vivo*. Минервин С.М. с соавт. [1959] разработали ускоренный метод диагностики ботулизма посредством определения фагоцитарного показателя. Он основывается на том, что ботулотоксин резко подавляет фагоцитарную функцию лейкоцитов. Гомологичная анитоксическая ботулиновая сыворотка нейтрализует действие экзотоксина, что не происходит при действии гетерологичных сывороток. Ее недостатком является невозможность использования для обнаружения ботулотоксина в пищевых продуктах и секционном материале.

Оценка активности нейротоксина ботулизма типа А возможна путем подкожной инъекции лабораторных животных, однако, это требует подтверждения традиционным биологическим методом. Для микробиологического и эпидемиологического методов данный тест не был утвержден [182].

Другой альтернативный тест на крысах позволяет оценить электрический потенциал действия мышцы. Этот методический подход был использован для количественного определения концентрации ботулинического нейротоксина.

Электрический потенциал порождает сокращение мышечных волокон и изменение в результате действия нейротоксина на микроток [194].

Basavanna U. *et al.* [79] описали способ на основе нейрональных клеток, позволяющий заменить биологический метод, используя нейрональные клеточные линии (из спинного мозга крыс, клетки куриных эмбрионов, клетки нейробластомы) [113].

Иммуноферментный анализ [12, 59], широко применяется для определения и количественной дифференциации типов ботулинических токсинов [188]. ИФА, предложенный Ekong T.A. *et al.* [107] основывается на связывании ботулинического нейротоксина со специфичными антителами, количество которого можно определить по калибровочной кривой. Существенным недостатком является низкая чувствительность анализа, которая в 10-100 раз ниже, чем при определении летальной дозы у лабораторных мышей. По данным Scotcher M.C. *et al.* [178] чувствительность иммуноферментного анализа можно повысить за счет применения меченных биотином антител.

Lindstrom M. *et al.* [152] описана детекция и идентификация токсинов ботулизма типов А, В, Е и F в продуктах питания и биологическом материале от человека с помощью мультиплексного ПЦР анализа.

Кроме того, был разработан масс-спектрометрический метод определения эндопептидазной активности ботулиновых токсинов различных серотипов в клинических образцах [121, 138]. Использование антител позволило значительно обогатить образцы исследуемыми токсинами и в дальнейшем определить их ферментативную активность по расщеплению введенного пептида. Также этим методом исследовали ингибирование эндопептидазной активности ботулиновых токсинов [78].

Столбнячный токсин относится к экзотоксинам и состоит из двух фракций: тетаноспазма со свойствами нейротоксина, который поражает двигательные клетки центральной нервной системы и вызывает сокращение поперечно-полосатых мышц и тетаногемолизина, лизирующего эритроциты. Обычно столбнячный токсин определяется биологическим, либо иммунологическими методами [141]. Буркиным М.А. с соавт. [13] описано получение моноклональных антител ТТ-1, ТТ-2 и ТТ-3 к столбнячному токсину/анатоксину, на основе которых проведены разработка и сравнение нескольких вариантов количественного определения столбнячных анатоксина

и токсина в иммуноферментном анализе. Был успешно применен метод MALDI-TOF-MS для характеристики С-фрагмента столбнячного токсина и его комплексов с доксорибуцином и другими лигандами [186, 187].

Дифтерийный токсин представляет собой высокотоксичный внеклеточный белок, воздействие которого на чувствительных к нему животных и людей летально в дозе 100 нг/кг массы тела и менее [129, 165, 173]. В настоящее время для идентификации дифтерийного токсина в клинических образцах распространены микробиологический метод Элека [40, 110], иммунопреципитация [48], реакция коаггутинации с антигенным диагностикумом [23, 134], латекс-агглютинация [193], а также иммуноаналитические методы [126, 167]. Наиболее чувствительным из предложенных иммунохимических методов определения дифтерийного токсина являются иммуноферментные тест-системы на основе моноклональных антител к его специфическим эпитопам [28, 65], а также «сэндвич»-вариант ИФА, разработанный Engler К.Н. *et al.* [110], где используются поликлональные лошадиные антитела к дифтерийному токсину в качестве связывающих и меченные щелочной фосфатазой моноклональные антитела в качестве проявляющих. Данный метод позволяет определять дифтерийный токсин в минимальной концентрации 0,1 нг/мл. В нашей стране также был разработан «сэндвич»-вариант ИФА и диагностическая система «Дифтерия-Монозим» на его основе, которая была разрешена к применению в практике здравоохранения. Чувствительность определения дифтерийного токсина с помощью данной системы составила 2–4 нг/мл [64, 65]. Engler К.Н. *et al.* [111] разработали иммунохроматографический метод определения дифтерийного токсина, где использовали смешанную поликлонально-моноклональную систему. Порог чувствительности разработанного авторами иммунохроматографического метода составил 0,5 нг/мл, однако, для выявления токсина методом иммунохроматографии в клинических образцах (мазках) пробы исследуемый материал необходимо было подвергнуть предварительной культивации в течение 3 ч при 37 °С в аэробных условиях. Для выявления различных биомолекул, в том числе и токсинов, в настоящее время разрабатываются мультиплексные системы, примером которых являются трехмерные гелевые микрочипы с иммобилизованными «связывающими» антителами, дающих возможность в экспресс-режиме анализировать одновременно множество образцов биомолекул, в том числе и дифтерийный токсин [175].

Стафилококковые энтеротоксины представляют собой простые токсины, молекула которых состоит из одной полипептидной цепи. Выделены и изучены четыре типа стафилококковых энтеротоксинов со специфическими антигенными свойствами (А, В, С и F). Наиболее подробно охарактеризован стафилококковый энтеротоксин типа В. Все стафилококковые энтеротоксины независимо от типа, обладают похожим биологическим действием, что свидетельствует о схожести отдельных участков их структуры. Наличие в пробе 100-200 нг энтеротоксина приводит к развитию пищевой токсикоинфекции. Обычно же в пищевой пробе он содержится в концентрации 0,5-10 мкг на 100 г продукта [114].

Известен способ определения активности стафилококкового токсина на модели кроликов при внутривенном введении [171]. Способ дорогостоящий и трудоемкий в исполнении.

Для тестирования продуктов питания на содержание в них стафилококкового энтеротоксина используют биологические методы (тестирование на животных), различные инструментальные методы (масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез), а также иммунологические методы анализа (ИФА, метод иммунодиффузии) [148]. До последнего времени преимущественно использовали метод иммунодиффузии в геле [84]. Предел обнаружения этим методом составляет 100 нг/мл в пробе, при продолжительности анализа 3 суток. Для анализа стафилококкового энтеротоксина в продуктах питания наибольшее распространение получили иммунохимические методы, прежде всего ИФА [192]. Среди коммерческих иммуноферментных тест-систем выделяют Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins Diffchamb AB (Diffchamb, Франция) предел обнаружения составляет 0,1 нг/мл, Tecra Staphylococcal Enterotoxin visual immunoassay (Bioenterprises Pty Ltd., Австрия) – 0,1 нг/мл, а также набор RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E (R-Biopharm AG, Германия), рекомендованный Роспотребнадзором как метод определения стафилококкового энтеротоксина в пищевых продуктах [42] с чувствительностью 0,1 нг/мл. Время проведения ИФА составляет несколько часов и выполнение требует наличие лабораторий, имеющих необходимое оборудование и высококвалифицированных специалистов.

Согласно данным Collins W.S. *et al.* [96] чувствительность радиоиммунного метода в 100 раз выше иммунодиффузионной преципитации. В настоящее время

существуют коммерческие наборы для определения стафилококковых энтеротоксинов методом обратной пассивной латексной агглютинации, которые предназначены для их быстрого обнаружения в пищевых продуктах и не уступают по чувствительности радиоиммунному анализу. Существующая тест-система на основе обратной пассивной латексной агглютинации позволяет одновременно выявлять стафилококковые энтеротоксины А, В, С и D в экстрактах пищевых продуктов, фильтратах культур стафилококка. Однако Haines S.D. и Stannard C. J. [125] сообщили о возможных неспецифических реакциях в некоторых продуктах, таких как сыры, креветки. Минимизировать неспецифические реакции можно путем добавления 10 нмоль/л гексаметофосфата [174]. В последние годы появились работы, в которых для определения структуры и идентификации энтеротоксина применяются масс-спектрометрические методы [86, 161, 162, 163]. Идентификацию энтеротоксина В также осуществляют зарекомендованным в последние годы методом MALDI-TOF [140, 162, 180, 197]. Обычно исследуемым образцом является материал чистой культуры микроорганизма, выращенного на твердой питательной среде, но возможна идентификация микробного агента в жидких питательных средах и биологических жидкостях [117, 170]. Kull S. *et al.* [145] разработали метод, позволяющий определять токсин в сложных биологических образцах с высокой чувствительностью (500 фмоль), основанный на высокоспецифичном аффинном выделении энтеротоксина с последующим MALDI-MS-анализом.

Стрептококки образуют ряд экзотоксинов: стрептолизины, разрушающие эритроциты (О-стрептолизин обладает кардиотоксическим действием); лейкоцидин, разрушающий лейкоциты (образуется высоковирулентными штаммами); эритрогенный (скарлатинозный) токсин – обуславливает клиническую картину скарлатины – интоксикацию, сосудистые реакции, сыпь и пр. Токсины являются мощными антигенами, в ответ на действие которых вырабатываются соответствующие антитела. Обнаружение повышения их титра при серологическом исследовании крови пациентов в динамике (реакции коаггутинации и латекс-агглютинации) дает возможность диагностировать заболевание [91, 190, 191].

Патогенность энтеротоксигенных *E.coli* связана с выработкой 2 энтеротоксинов, которые вызывают развитие секреторной диареи: термолабильного (LT), структурно и

функционально связанного с холерным токсином, и термостабильного (ST) энтеротоксинов.

Были описаны методы обнаружения в лабораторных условиях LT и ST *in vivo* и *in vitro* в подвздошной петле кишечника кроликов и культуре клеток [90, 123, 153], а также с помощью радиоиммунного анализа с применением клеток надпочечников мышей [154], но эти методы не нашли широкого применения. Чувствительность использованной для определения продукции энтеротоксина у 273 штаммов кишечной палочки, выделенных от больных, и у 516 штаммов музейных культур модифицированной реакции иммунодиффузии по Элеку составила 99% [130]. Однако учет результатов был возможен только через 3-4 дня. Scotland S.M. *et al.* [181] с помощью конкурентного иммуноферментного анализа предложили определение ST в культуре клеток в течение 3-4 часов с чувствительностью 10 нг/мл.

Бактерии *Bacillus cereus* продуцируют несколько токсинов, включая некротизирующий энтеротоксин, рвотный токсин, фосфолипазу С, протеазы, гемолизины и энтеротоксины, которые являются важными детерминантами вирулентности. Энтеротоксин и рвотный токсин ответственны за симптомы диареи и рвоты, имеющие место при гастроинтестинальных заболеваниях [93, 104, 105, 122].

Для подтверждения наличия *Bacillus cereus* или токсинов в пищевых продуктах и клинических образцах за рубежом используют серологические и молекулярно-генетические методы [137].

Раньше для скрининга рвотного токсина применяли биологический метод, однако из-за кропотливости выполнения и дорогого содержания животных, где в качестве биомодели выступали обезьяны, широкого применения он не получил [156]. Обнаружение диспепсического токсина возможно биологическим методом при заражении кролика через петли подвздошной кишки и оценки сосудистой проницаемости [144]. Подтверждение наличия диспепсического токсина в культуральном супернатанте можно осуществить с помощью двойной гель иммунодиффузии [81]. Также существуют коммерческие наборы, позволяющие быстро обнаружить диспепсический токсин в пищевых продуктах. По данным, представленным Granum P.E. *et al.* [124] по сравнению с вестерн иммуноблоттингом и оценкой проницаемости BCET-RPLA (Oxoid Ltd) позволяет выявить 94,5 % из 110 энтеротоксигенных штаммов, однако Buchanan R.L. *et al.* [89] выявили, что с помощью

BCET-RPLA (Oxoid Ltd) не удается обнаружить диспептический энтеротоксин, выявляемый в анализе клеточных культур. Эти данные подтвердили в своих работах Christiansson A. [95] и Notermans S. *et al.* [164].

Clostridium perfringens – возбудитель заболевания острой инфекционной природы с энтеральным путем заражения, которое проявляется синдромом гастроэнтерита или энтероколита и инфекционным токсикозом, реже некротическим энтеритом или сепсисом. Выделяют пять серотипов (А-Е), ранжированных по наличию токсинов.

Поскольку клинические проявления болезни полиморфны и характерны для многих диарейных инфекций решающее значение приобретает лабораторная диагностика: обнаружение энтеротоксина в фекалиях экспресс-методами (РНГА и ИФА) и определение энтеротоксигенности у выделенных штаммов клостридий. Tranter S.H. *et al.* [195] описали ИФА, предназначенный для определения токсина типа А с чувствительностью метода 1-2 нг/мл и коммерческий препарат для обнаружения токсина типа А в клиническом материале (фекалиях) и фильтратах культуры с чувствительностью 2 нг/мл.

Протективный антиген (ПА) сибирской язвы представляет собой основной компонент экзотоксина, определяющего патогенность токсигенных штаммов *Bacillus anthracis* [166]. По мнению Kobilier D. *et al.* [142], применение в клинической практике специфичных и высокочувствительных диагностических тест-систем, способных определять крайне низкие (менее 1 нг) концентрации ПА на ранних этапах сибиреязвенной инфекции, предотвращает риск летального исхода, а для эффективной профилактики последствий массовых эпидемий или биотеррористических атак необходима детекция протективного антигена в количестве менее 1-10 пг/мл.

Известен способ детекции антител к протективному антигену сибирской язвы с помощью ИФА ("Anthrax Protective Antigen IgG ELISA", BioQuant, США), однако такие антитела можно обнаружить лишь на поздних стадиях инфекции, когда терапия неэффективна. Сибиреязвенные диагностические тест-системы, разработанные на основе традиционной ПЦР [127, 157] имеют ряд недостатков, среди которых: длительная и сложная схема пробоподготовки, необходимая для получения воспроизводимых результатов и исключения ложноположительных сигналов, сложность количественной оценки результатов анализа, а также невозможность применения этих систем на ранних стадиях инфекционного процесса.

Применение различных вариантов ПЦР в режиме реального времени способствует повышению чувствительности и воспроизводимости сибиреязвенных диагностических тест-систем. Весьма перспективным показал себя методический подход, использованный для конструирования сибиреязвенных диагностических наборов, путем сочетанного применения принципов иммуно- и генодиагностики [132, 143].

Основным показателем, характеризующим эпидемический потенциал возбудителя холеры, является его токсигенность [35, 57, 115,].

Для обнаружения и мониторинга холерного токсина традиционно в лабораторных условиях используют биологические тесты на животных и клеточных культурах, иммунохимические методы, ИФА, иммупреципитацию, иммунофлуоресцентный анализ, а также полимеразную цепную реакцию.

Datta N.K. *et al.* [98] впервые смогли определить активность холерного экзотоксина на модели 10-дневных крольчат-сосунков. Эта модель широко использовалась, однако, не лишена была ряда недостатков: невозможность определить количество титруемого токсина, длительность получения ответа (2-е суток), высокая стоимость исследования. Позднее Virochs W. *et al.* [88] был описан способ определения токсина на лигированных петлях подвздошной кишки взрослых кроликов. Метод достаточно информативный, доступный, однако дорогостоящий, сложный в исполнении с ответом через 18 часов.

Существует также метод определения биологической активности холерогена по величине отека при введении в подушечку конечностей белых крыс и мышей фильтрата культуры *V.cholerae*, который более чувствителен и доступен [24, 74]. Для оценки вирулентности холерных вибрионов и эпидемической значимости выделенных штаммов с 90-х годов у нас в стране применяется метод молекулярного зондирования гена холерного токсина с помощью ДНК-зондов с радиоактивными и нерадиоактивными метками [7, 18].

Комплексный пробирочный метод определения вирулентности холерных вибрионов, основанный на оценке его культуральных, биохимических, антигенных свойств, лизабельности холерными диагностическими бактериофагами и гемолитической активности, широко применяется в практических лабораториях. Применение данного метода показало его высокую эффективность и надежность.

Сотрудниками РосНИПЧИ "Микроб" была разработана высокочувствительная до-иммуноферментная тест-система, благодаря которой свободный и локализованный холерный токсин обнаруживался уже в трех- и шестичасовых культурах *V.cholerae* [4, 73]. Остроумова Н.М. с соавт. [58] разработали метод идентификации и дифференциации эпидемиологически опасных и неопасных холерных вибрионов биовара эльтор с использованием трех тестов: чувствительности к фагам ctx^+ и ctx^- и гемолитической активности в пробе Грейга. В последние годы для определения вирулентности холерных вибрионов предложен метод генного зондирования, позволяющий детектировать структурный ген оперона *ctx*, детерминирующий синтез холерного токсина [7, 18].

Отечественными учеными на основе МКА к В-субъединице ХТ разработан прямой и «сэндвич»-вариант ДИА для идентификации токсигенных штаммов *V.cholerae*, обеспечивающие обнаружение ХТ в культуральной жидкости и микробных клетках. Более эффективным оказался «сэндвич»-вариант ДИА, в котором токсинсодержащие холерные вибрионы регистрировались в концентрации $2,4 \times 10^6$ - $4,9 \times 10^6$ м.кл./мл, что соответствовало 16 нг/мл ХТ. Длительность анализа составляла не более 1,5 ч для «сэндвич»-варианта и 40-50 мин – для прямого ДИА [20].

Белой Ю.А. с соавт. [10] предложен антительный коаггулинирующий диагностикум, обнаруживающий очищенный холерный энтеротоксин в растворах в количестве 1-10 нг/мл. Высокой чувствительностью и специфичностью обладал зарубежный аналог, где в качестве носителя антител использованы латексные частицы [76].

Оригинальный иммунофлуоресцентный метод с использованием ганглиозид-содержащей DASS-системы (или системы шарообразных субстратов для определения антигенов) и люминесцирующей холерной антитоксической сыворотки оказался весьма эффективным при определении холерогена [14]. С помощью специфических МКА к В-субъединице ХТ методом непрямой иммунофлуоресценции удалось обнаружить гомологичный антиген непосредственно на поверхности вибрионов на ранних этапах культивирования [3]. При определении холерогена за рубежом широко применяются методы иммуноферментного анализа [139].

Mousavi S.L. *et al.* [158] сообщают об успешной попытке применения сочетанного метода ПЦР-ИФА для обнаружения токсигенных штаммов *V.cholerae* O1, с

чувствительностью 0,5 пг ДНК и 5 м.кл., а учеными из Тайваня разработан иммуносенсор, позволяющий выявлять $6,6 \times 10^{-17}$ г/мл холерного токсина [128].

Для одновременной детекции токсигенных и нетоксигенных штаммов *V.cholerae* O1, O139, не O1 и не O139 в клинических образцах и образцах воды индийскими учеными предложен дипстик-ELISA на основе поли- и моноклональных антител к двум рекомбинантным белкам – В-субъединице холерного токсина и белку внешней мембраны OmpW [196], а Yonekita T. *et al.* [205] разработали метод, позволяющий определить холерный токсин с помощью иммунохроматографических тест-полосок, через 15 минут после нанесения исследуемого образца

Таким образом, для обнаружения токсинов бактериального происхождения, играющих значительную роль в патогенезе многих инфекционных болезней, разработаны и широко используются разнообразные методы. Причем некоторые из них, появившиеся вначале прошлого столетия на заре развития микробиологии как науки, до сих пор не утратили своего практического значения, прежде всего, как надежные и простые в техническом исполнении диагностические процедуры. Современные диагностические препараты должны отвечать требованиям высокой чувствительности, специфичности, экспрессности, возможности использования не только в хорошо оснащенных лабораториях, но и в полевых условиях. В последние десятилетия взамен диагностических реакций агглютинации, преципитации, гемагглютинации и ряда других пришли современные иммунохимические методы диагностики, причем среди иммунодиагностических тест-систем наибольшее распространение получили различные варианты ИФА, которые хорошо себя зарекомендовали на разных уровнях лабораторной диагностики инфекционных болезней, в том числе особо опасных.

Отечественными специалистами были предприняты ряд удачных попыток конструирования экспериментальных иммунодиагностических препаратов для определения токсигенных штаммов холерных вибрионов [4, 20, 26], однако, до практического применения они так и не были доведены. Таким образом, вопрос о научно-технологической разработке и внедрении в практику соответствующей иммунодиагностической тест-системы, вплоть до ее государственной регистрации остается открытым.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Материалом для исследования служили: бульонные культуры микроорганизмов, пробы биологического материала от человека (испражнения), искусственно контаминированные возбудителями холеры и гетерологичными микроорганизмами.

2.1.1 Штаммы микроорганизмов

Работа выполнена на 99 штаммах микроорганизмов, полученных из ГКПБ РосНИПЧИ «Микроб» (таблицы 1, 2).

Для исследования были выбраны 87 штаммов *V.cholerae*, из них: 48 – *V.cholerae* эльтор (*ctxAB*⁺), 20 – *V.cholerae* эльтор (*ctxAB*⁻), 2 – *V.cholerae* классического биовара (*ctxAB*⁺), 6 – *V.cholerae* O139 (*ctxAB*⁺), 1 – *V.cholerae* O139 (*ctxAB*⁻), 2 – *V.cholerae* non O1/O139 (*ctxAB*⁺), 8 – *V.cholerae* non O1/O139 (*ctxAB*⁻), а также 4 – *Escherichia coli*; 1 – *Salmonella paratyphi* A, 1 – *Salmonella paratyphi* B, 1 – *Salmonella typhi*; 1 – *Salmonella typhimurium*, 2 – *Shigella dysenteriae sonnei*, 1 – *Shigella dysenteriae flexneri*, 1 – *Yersinia enterocolitica*. Используемые в работе штаммы были типичными по культуральным, морфологическим, биохимическим, серологическим.

2.1.2 Антигены

Для иммунизации животных, скрининга антителопродуцирующих гибридом, изучения эпитопной направленности МКА в ТИФА использовали холерный токсин, выделенный из штамма *V.cholerae* 569 В по методу Mekalanos J.J. *et al.* [155] и любезно предоставленный к.б.н. Захаровой Т.Л., а также коммерческие препараты холерного токсина и его субъединицы В (Sigma, США). Для определения специфичности полученных МКА применяли термолабильный токсин кишечной палочки, любезно предоставленный сотрудниками ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков Шемакина М.М. и Овчинникова Ю.А. РАН г. Москва.

Таблица 1 Характеристика штаммов *Vibrio cholerae*, использованных в работе

| NN п/п | Штамм | Характеристика | Год выделения | Источник выделения | Место выделения |
|--|-----------------------------|--------------------|------------------|-----------------------|------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| <i>Vibrio cholerae</i> O1 серогруппы классического биовара | | | | | |
| 1 | <i>V.cholerae</i> М-41 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1943 | н/д | Башкортостан |
| 2 | <i>V. cholerae</i> 569 В | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1950 | человек | Индия, г. Бомбей |
| <i>Vibrio cholerae</i> O1 серогруппы эльтор биовара | | | | | |
| 1 | <i>V.cholerae</i> МАК 757 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1937 | н/д | Индонезия |
| 2 | <i>V.cholerae</i> М-295 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1965 | н/д | Туркменистан |
| 3 | <i>V.cholerae</i> М-311 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1965 | н/д | Каракалпакия |
| 4 | <i>V.cholerae</i> М-388 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1965 | н/д | Каракалпакия |
| 5 | <i>V.cholerae</i> МЕ-7 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1966 | вода | Индия |
| 6 | <i>V.cholerae</i> М-712 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1970 | н/д | Московская обл. |
| 7 | <i>V.cholerae</i> М-713 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1970 | н/д | Московская обл. |
| 8 | <i>V.cholerae</i> М-736 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1970 | н/д | Пермь |
| 9 | <i>V.cholerae</i> М-738 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1970 | н/д | Пермь |
| 10 | <i>V.cholerae</i> М-799 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1970 | человек | Саратов |
| 11 | <i>V.cholerae</i> М-818 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1970 | н/д | Балаково |
| 12 | <i>V.cholerae</i> М-887 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1970 | н/д | Астрахань |
| 13 | <i>V.cholerae</i> М-888 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1970 | н/д | Астрахань |
| 14 | <i>V.cholerae</i> Р-3116 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1970 | человек | Украина |
| 15 | <i>V.cholerae</i> Р-3122 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1970 | н/д | Украина |
| 16 | <i>V.cholerae</i> М-879 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1971 | человек | Саратов |
| 17 | <i>V.cholerae</i> М-1011 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1972 | н/д | Башкортостан |
| 18 | <i>V.cholerae</i> М-1013 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1972 | н/д | Башкортостан |
| 19 | <i>V.cholerae</i> М-641 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1975 | человек | Астрахань |
| 20 | <i>V.cholerae</i> 95 Гвинея | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1986 | н/д | Гвинея |
| 21 | <i>V.cholerae</i> Р-13762 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1988 | н/д | Узбекистан |
| 22 | <i>V.cholerae</i> С-402 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1990 | человек | Ставрополь |
| 23 | <i>V.cholerae</i> С-447 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1990 | человек | Ставрополь |
| 24 | <i>V.cholerae</i> Р-15431 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1991 | н/д | Украина |

Продолжение таблицы 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----|---------------------------|---|------|---------|------------------|
| 25 | <i>V.cholerae</i> P-15678 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1991 | н/д | Украина |
| 26 | <i>V.cholerae</i> M-1264 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1993 | н/д | Краснодар |
| 27 | <i>V.cholerae</i> M-1272 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1993 | н/д | Краснодар |
| 28 | <i>V.cholerae</i> M-1275 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1993 | н/д | Дагестан |
| 29 | <i>V.cholerae</i> M-1297 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1993 | н/д | Дагестан |
| 30 | <i>V.cholerae</i> M-1298 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1993 | н/д | Краснодар |
| 31 | <i>V.cholerae</i> M-1268 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1994 | н/д | Магнитогорск |
| 32 | <i>V.cholerae</i> M-1269 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1994 | н/д | Магнитогорск |
| 33 | <i>V.cholerae</i> P-17644 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1995 | н/д | Ачинск |
| 34 | <i>V.cholerae</i> P-17645 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1995 | н/д | Иркутск |
| 35 | <i>V.cholerae</i> P-17647 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1995 | н/д | Ачинск |
| 36 | <i>V.cholerae</i> M-1326 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1998 | человек | Дагестан |
| 37 | <i>V.cholerae</i> M-1328 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 1998 | человек | Дагестан |
| 38 | <i>V.cholerae</i> M-1344 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 2001 | н/д | Казань |
| 39 | <i>V.cholerae</i> M-1345 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 2001 | человек | Казань |
| 40 | <i>V.cholerae</i> M-1349 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 2001 | н/д | Казань |
| 41 | <i>V.cholerae</i> M-1429 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 2004 | человек | Башкортостан |
| 42 | <i>V.cholerae</i> M-1430 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 2005 | человек | Тверь |
| 43 | <i>V.cholerae</i> P-18899 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 2006 | человек | Мурманск |
| 44 | <i>V.cholerae</i> M-1461 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 2010 | человек | Москва |
| 45 | <i>V.cholerae</i> M-1462 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 2010 | человек | Москва |
| 46 | <i>V.cholerae</i> M-1463 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 2010 | человек | Москва |
| 47 | <i>V.cholerae</i> M-1509 | <i>ctxAB+tcpA+</i> | 2012 | человек | Химки |
| 48 | <i>V.cholerae</i> 97 МАК | <i>ctxAB tcpA+</i> | 1937 | н/д | о. Целебес |
| 49 | <i>V.cholerae</i> CW-6 | <i>ctxAB⁻ tcpA⁻</i> | 1966 | вода | Индия |
| 50 | <i>V.cholerae</i> KM-27 | <i>ctxAB⁻ tcpA⁻</i> | 1967 | н/д | н/д |
| 51 | <i>V.cholerae</i> KM-26 | <i>ctxAB⁻ tcpA⁻</i> | 1982 | вода | н/д |
| 52 | <i>V.cholerae</i> M-1242 | <i>ctxAB⁻ tcpA⁻</i> | 1989 | н/д | Астрахань |
| 53 | <i>V.cholerae</i> M-1262 | <i>ctxAB⁻ tcpA⁻</i> | 1990 | н/д | Удмуртия |
| 54 | <i>V.cholerae</i> M-1256 | <i>ctxAB⁻ tcpA⁻</i> | 1991 | н/д | Татарстан |
| 55 | <i>V.cholerae</i> M-1257 | <i>ctxAB⁻ tcpA⁻</i> | 1991 | вода | Ульяновская обл. |

Продолжение таблицы 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------------------------|---------------------------|--|------|---------|--------------------|
| 56 | <i>V.cholerae</i> M-1258 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 1991 | н/д | Самара |
| 57 | <i>V.cholerae</i> M-1280 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 1992 | н/д | Астрахань |
| 58 | <i>V.cholerae</i> M-1265 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 1994 | н/д | Башкортостан |
| 59 | <i>V.cholerae</i> M-1332 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2000 | н/д | Челябинск |
| 60 | <i>V.cholerae</i> M-1379 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2001 | н/д | Казань |
| 61 | <i>V.cholerae</i> M-1434 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2006 | вода | Элиста |
| 62 | <i>V.cholerae</i> M-1436 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2006 | вода | Калмыкия |
| 63 | <i>V.cholerae</i> M-1445 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2007 | вода | Калмыкия |
| 64 | <i>V.cholerae</i> M-1456 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2009 | вода | Калмыкия |
| 65 | <i>V.cholerae</i> M-1460 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2010 | н/д | Казань |
| 66 | <i>V.cholerae</i> M-1504 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2011 | н/д | Калмыкия |
| 67 | <i>V.cholerae</i> M-1508 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2011 | н/д | Калмыкия |
| 68 | <i>V.cholerae</i> M-1511 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2012 | н/д | Челябинская обл. |
| <i>Vibrio cholerae</i> O139 | | | | | |
| 1 | <i>V.cholerae</i> Ap 1 | <i>ctxAB⁺tcpA⁺</i> | н/д | человек | Индия Андра Прадеш |
| 2 | <i>V.cholerae</i> sq-24 | <i>ctxAB⁺tcpA⁺</i> | 1992 | н/д | Индия |
| 3 | <i>V.cholerae</i> MO-45 | <i>ctxAB⁺tcpA⁺</i> | 1992 | н/д | Индия |
| 4 | <i>V.cholerae</i> P-16064 | <i>ctxAB⁺tcpA⁺</i> | 1993 | человек | Азов |
| 5 | <i>V.cholerae</i> P-16065 | <i>ctxAB⁺tcpA⁺</i> | 1993 | человек | Азов |
| 6 | <i>V.cholerae</i> P-16131 | <i>ctxAB⁺tcpA⁺</i> | 1993 | человек | Ростовская обл. |
| 7 | <i>V.cholerae</i> M-375 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 1999 | вода | Жуковский |
| <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 | | | | | |
| 1 | <i>V.cholerae</i> P-13673 | <i>ctxAB⁺tcpA⁺</i> | 1987 | н/д | Узбекистан |
| 2 | <i>V.cholerae</i> P-16132 | <i>ctxAB⁺tcpA⁺</i> | 1990 | человек | Узбекистан |
| 3 | <i>V.cholerae</i> M-266 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 1981 | человек | Астрахань |
| 4 | <i>V.cholerae</i> M-513 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2007 | человек | н/д |
| 5 | <i>V.cholerae</i> M-522 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2007 | вода | Якутия |
| 6 | <i>V.cholerae</i> M-519 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2008 | человек | Астраханская обл. |
| 7 | <i>V.cholerae</i> M-521 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | 2008 | вода | Астраханская обл. |
| 8 | <i>V.cholerae</i> M-512 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | н/д | н/д | н/д |

Продолжение таблицы 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----|-------------------------|--|-----|-----|-----|
| 9 | <i>V.cholerae</i> М-526 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | н/д | н/д | н/д |
| 10 | <i>V.cholerae</i> М-529 | <i>ctxAB⁻tcpA⁻</i> | н/д | н/д | н/д |

Примечание: н/д – нет данных

Таблица 2 Характеристика штаммов гетерологичных микроорганизмов, использованных в работе

| NN п/п | Штамм | Год выделения | Источник выделения | Место выделения |
|-----------|--|--|-----------------------|-----------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | <i>Escherichia coli</i> O111-BH-3133 | получен из института Пастера г. Ленинград | | |
| 2 | <i>Escherichia coli</i> 18 | 1943 | человек | Саратов |
| 3 | <i>Escherichia coli</i> 1180 | 1974 | человек | Саратов |
| 4 | <i>Escherichia coli</i> O157 | н/д | н/д | н/д |
| 5 | <i>Salmonella paratyphi</i> A 27 | получен из ГИСК им. Л.А. Тарасевича, год выделения 1949 г. | | |
| 6 | <i>Salmonella paratyphi</i> B 61951 | 1966 | человек | Саратов |
| 7 | <i>Salmonella typhi</i> 503 | получен из ГИСК им. Л.А. Тарасевича, год выделения 1956 г. | | |
| 8 | <i>Salmonella typhimurium</i> 20 | 1947 | н/д | Чита |
| 9 | <i>Shigella dysenteriae sonnei</i> 59097 | 1976 | человек | Саратов |
| 10 | <i>Shigella dysenteriae sonnei</i> 58008 | 1976 | человек | Саратов |
| 11 | <i>Shigella dysenteriae flexneri</i> 58848 | 1976 | человек | Саратов |
| 12 | <i>Yersinia enterocolitica</i> 96 | 1979 | н/д | Алма-Ата |

Примечание: н/д – нет данных

2.1.3 Реактивы, питательные среды

В работе использовали реактивы отечественного и зарубежного производства, соответствующие квалификации чистоты «осч», «хч», «чда», пристан (Sigma, США), гибридная среда Hybridomia Express Plus (РАА, Австрия), нормальная лошадиная сыворотка (Flow Laboratories, Великобритания), эмбриональная телячья сыворотка (РАА, Австрия), амфотерицин (Sigma, США), гентамицин (Sigma, США), стрептомицин (Sigma, США), пенициллин (Sigma, США), L-глутамин (Sigma, США), НАТ (Sigma,

США), НТ (Sigma, США), полиэтиленгликоль (ПЭГ) с м.м. 4000 кДа (Merck, Германия), диметилсульфоксид (ДМСО) (Serva, Германия), фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (ПанЭко, Россия), молоко сухое обезжиренное (лактальбумин) (ГОСТ 10970-87), твин-20 (Serva, Германия), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Sigma, США), лимонная кислота (ТУ 6-09-584-75) (Нева, Россия), цитрат натрия (ТУ 6-09-2248-77) (Нева, Россия), гидроперит (Татхимфармпрепараты, Россия), пероксидаза хрена (AppliChem, Германия), N,N'-метилен-бис-акриламид (AppliChem, Германия), додецилсульфат натрия (SDS) (Serva, Германия), TEMED (Amresco, США), 2-меркаптоэтанол (Amresco, США), бромфеноловый синий (Reanal, Венгрия), кумасси Brilliant Blue R-250 (Bio Rad, США), акриламид (Serva, Германия), ацетат натрия (CH₃COONa) (ГОСТ 199-68) (Нева, Россия), боргидрид натрия (NaBH₄) (Sigma, США), гидрокарбонат натрия (NaHCO₃) (ГОСТ 4201-79) (Нева, Россия), гидроксид натрия (NaOH) (ГОСТ 4328-77) (Нева, Россия), гидрофосфат калия (K₂HPO₄) (ГОСТ 4214-75) (Нева, Россия), глицерин (Serva, Германия), глицин (Amresco, США), деионизованная вода (с сопротивлением 15-18 мОМ/см), дигидрофосфат калия (KH₂PO₄) (ГОСТ 4198-75) (Нева, Россия), дистиллированная вода, периодат натрия (NaIO₄) (Sigma, США), персульфат аммония ((NH₄)₂S₂O₈) (Serva, Германия), соляная кислота (HCl) (ГОСТ 3116-77), сульфат аммония (NH₄)₂SO₄ (ТУ 2141-036-05761689-2000) (Нева, Россия), трис(гидроксиметил)-аминометан (трис) (Sigma, США), уксусная кислота (ГОСТ 61-75), хлорид аммония (NH₄Cl) (ГОСТ 3773-72) (Нева, Россия), этанол 96° (ГОСТ 5962-67), Тиомерсал (Acros, США), полный адьювант Фрейнда (ПАФ) (Sigma, США).

Для культивирования микроорганизмов использовали следующие питательные среды: бульон Хоттингера, pH 7,2 и 7,6 [43]; 1 % пептонная вода (из пептона основного (ГНЦ ПМБ, п. Оболенск); агар Хоттингера, pH 7,2 и 7,6 [43]; мясопептонный агар, pH 7,2, (лабораторного приготовления в отделе питательных сред РосНИПЧИ «Микроб»).

Индукцию ХТ у штаммов *V.cholerae* осуществляли на среде АКІ, для приготовления 100 мл которой требуется бакто-пептон 1,5 г, дрожжевой экстракт 0,4 г, хлорид натрия 0,5 г, 0,8 % раствор гидрокарбоната натрия 3 мл [133].

2.1.4 Растворы

2.1.4.1 Насыщенный раствор сернокислого аммония:

Навеску сернокислого аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ массой 760 г растворяли в 1000 мл дистиллированной воды на водяной бане при температуре $(100 \pm 5)^\circ\text{C}$. После остывания раствор помещали в холодильник до выпадения кристаллов соли. Над осадком образуется насыщенный раствор, pH которого доводили до $7,2 \pm 0,2$ добавлением раствора аммиака. Профильтрованный раствор должен быть прозрачным и бесцветным. Полученный раствор хранили при температуре 4°C в течение 6 месяцев.

2.1.4.2 0,2 М карбонат-бикарбонатный буфер pH $9,0 \pm 0,5$:

Навеску Na_2CO_3 массой 0,636 г растворяли в 30 мл дистиллированной воды и объединяли с раствором NaHCO_3 , приготовленным путем растворения 1,18 г NaHCO_3 в 70 мл дистиллированной воды.

2.1.4.3 Натрий-ацетатный буфер 0,001 моль/л pH $4,2 \pm 0,2$:

Первоначально готовили буфер с концентрацией 0,1 моль/л. Для этого навеску ацетата натрия массой 6,8 г растворяли в 500 мл дистиллированной воды. Отдельно готовили раствор уксусной кислоты путем смешивания 6 мл CH_3COOH и 1000 мл дистиллированной воды. Затем полученные растворы смешивали в соотношении 1:2. Для приготовления буфера с концентрацией 0,001 моль/л полученный раствор разводили в 100 раз дистиллированной водой.

2.1.4.4 Цитратный буферный раствор 0,05 моль/л pH $4,2 \pm 0,2$:

Навеску лимонной кислоты массой 0,12 г растворяли в 10,8 мл дистиллированной воды. Навеску цитрата натрия массой 0,14 г растворяли в 9,2 мл дистиллированной воды. Для получения цитратного буфера полученные растворы объединяли.

2.1.4.5 Буферы для электрофореза в полиакриамидном геле (0,001 М ацетатный буфер, электродный буфер, буфер электропереноса, буфер образца) готовили в соответствии с рекомендациями Лефковитса И., Перис Б. [29].

2.1.5 Клеточные линии

Гибридизацию иммунных спленоцитов мышей линии BALB/c осуществляли с клетками сингенной плазмоцитомной линии *Sp2/0-Ag.8*, полученной из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург).

Соматические клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ и влажности не менее 80% в пластиковых 96-луночных планшетах (Costar, США,) и флаконах объемом 23 см³ (CorningFlack, США). Плазмоцитому *Sp2/0-Ag.8* и позитивные клоны гибридных клеток сохраняли в пробирках для криоконсервирования с фетальной сывороткой и добавлением в качестве криопротектора 10 % диметилсульфоксида при температуре минус 196 °С в сосудах Дьюара с жидким азотом.

2.1.6 Лабораторные животные

В работе использовали мышей инбредной линии BALB/c, сингенных по отношению к плазмацитоме *Sp.2/0- Ag.8*, в возрасте 8-12-недель весом 18-20 г. Для приготовления фидерных плат спленоциты изолировали из селезенок интактных аутбредных белых мышей 8-12-недельного возраста весом 25-30 г [61].

Животные были получены из питомника по разведению экспериментальных животных РосНИПЧИ «Микроб».

2.2 Микробиологические методы

2.2.1 Культивирование микроорганизмов

Ампулы с лиофилизированными культурами *V.cholerae*, *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Y.enterocolitica* вскрывали и вносили по 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлористого мерной пипеткой емкостью 1-2 мл II класса точности (ГОСТ 29227). После растворения микробные взвеси холерных вибрионов в объеме 0,1 мл засеивали с помощью этой же пипетки в 1 % пептонную воду (ГОСТ 13805-76), инкубировали в течение 3-6 ч при температуре (37±1) °С. Затем производили высев с помощью бактериальной петли № 2 на чашки Петри с агаром Хоттингера, pH 7,6±0,1 [41], инкубировали при температуре (37±1) °С в течение 18-20 ч.

Полученную суспензию бактерий *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Y.enterocolitica* в объеме 0,1 мл засеивали с помощью этой же пипетки в бульон Хоттингера, pH 7,2±0,1 [41], инкубировали в течение 18-20 ч при температуре (37±1) °С. Затем производили высев с помощью бактериальной петли № 2 на чашки Петри с

агаром Хоттингера, рН $7,2 \pm 0,1$ [43], инкубировали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18-20 ч.

2.2.2 Культивирование холерных вибрионов для индукции холерного токсина в соответствии с рекомендациями CDC

Работу по определению холерного токсина у штаммов холерных вибрионов проводили в боксе микробиологической безопасности II класса в противочумном костюме IV типа с резиновыми перчатками в соответствии с СП 1.3.3118 – 13 и руководством CDC [101].

Три колонии (диаметр 2-3 мм) исследуемого штамма или 1/2 петли (номер 5) агаровой культуры засеивали в стеклянную пробирку, содержащую 10 мл АКІ, и инкубировали 3,5 – 4 ч при температуре 30°C (первичное подращивание). Далее всю культуру переносили во флакон, содержащий 250 мл среды АКІ, и инкубировали при температуре 30°C в течение 17-19 ч при постоянном помешивании 250 об/мин на орбитальном термостатируемом шейкере (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Латвия). В полученном бульоне определяли наличие ХТ.

Оптимизированные условия культивирования холерных вибрионов для индукции холерного токсина, подбор которых осуществляли в рамках данной работы, представлены в соответствующих главах диссертации.

2.2.3 Подготовка проб

2.2.3.1 Приготовление бактериальных взвесей

Бактериальные взвеси клеток гетерологичных микроорганизмов готовили в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (ОСО 42-28-85-2015); для *V.cholerae* микробную взвесь готовили по отраслевому стандартному образцу мутности 5 единиц (ОСО 42-28-86-2015), что соответствует $1,1 \times 10^9$ м.к./мл.

2.2.3.2 Подготовка проб биологического материала, искусственно контаминированного возбудителем холеры и гетерологичными микроорганизмами

Пробы испражнений в количестве 1 г разводили в 10 раз 0,9 % раствором натрия хлорида и тщательно ресуспендировали. Затем отстаивали в течение 3-5 мин для оседания крупных частиц, отбирали по 0,9 мл из надосадочной жидкости и вносили в пробирки, содержащие 0,1 мл бульонной культуры *V.cholerae*.

Контаминацию испражнений осуществляли бульонной культурой токсигенных штаммов *V.cholerae* в концентрации от 1×10^9 до 1×10^2 м.к./мл содержащей ХТ, индукцию которого осуществляли по п.2.2.2.

2.3 Метод получения антителопродуцирующих гибридом

2.3.1 Гибридизация

Гибридизацию иммунных спленоцитов с миеломными клетками Sp2/0-Ag.8, полученными из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), выполняли по методу Galfré G. *et al.* [119].

Иммунизированную мышь обездвигивали цервикальной дислокацией. Выделенную селезенку помещали на 3-5 минут в 70 % этанол. Асептически, в стерильных условиях в боксе микробиологической безопасности II класса защиты надрезали селезеночную капсулу и вымывали пул лимфоцитов в солевую среду Hybridomia Express Plus, суспендировали пипеткой, переносили в стерильную центрифужную пробирку. Клетки осаждали центрифугированием при 800 об/мин в течение 10 минут. Супернатант удаляли, осадок разводили в 10 мл 0,83 % раствора NH_4Cl для разрушения присутствующих эритроцитов. Лимфоциты осаждали центрифугированием при 800 об/мин в течение 10 минут. Одновременно миеломные клетки, культивируемые *in vitro*, в логарифмической фазе роста в объеме 30-40 мл переносили в другую центрифужную пробирку и осаждали при 800 об/мин в течение 10 минут. Супернатант миеломной культуры удаляли, клеточный осадок лимфоцитов разводили в 10 мл солевой среды (Hybridomia Express Plus, Австрия), миеломные клетки – в 5 мл той же среды. Клеточные суспензии объединяли в одной центрифужной пробирке так, чтобы отношение количества миеломных клеток к лимфоцитам было 1:5. Объединенные клетки осаждали центрифугированием при 800 об/мин в течение 10 минут. Супернатант удаляли, а к клеточному осадку в течение 1 мин добавляли по каплям 1 мл 50 % раствора ПЭГ 4000 Да, выступающего в качестве сливающего агента

при гибридизации клеток. Для приготовления 50 % раствора 0,5 г ПЭГ расплавляли над пламенем горелки, остужали, добавляли 1 мл солевой среды, раствор суспендировали. Чтобы добиться равномерного распределения ПЭГ между клетками в течение 1 минуты при постоянном помешивании ПЭГ добавляли по каплям. Слияние клеток между собой проводили, центрифугируя их при 800 об/мин в течение 6 минут. Для предотвращения дальнейшего слияния и распределения слившихся клеток клеточную суспензию постепенно разбавляли солевой средой Hybridoma Express Plus, при этом, увеличивая объем вносимой среды в геометрической прогрессии: 1 мл в течение 1 минуты, 2 мл – 2 минуты, 4 мл – 3 минуты, 8 мл – 4 минуты, 16 мл – 5 минут. Слившиеся клетки, отмытые от сливающего агента, осаждали центрифугированием при 800 об/мин в течение 8 минут. Супернатант удаляли, клеточный осадок разводили селективной средой НАТ, суспендировали и вносили в лунки 96-луночного планшета, содержащие одно-двухсуточные фидерные клетки, по 100 мкл на лунку. Фидерные клетки выделяли из селезенки аутбредных мышей описанным выше способом. Культивирование гибридных клеток проводили в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С, 5 % содержании CO₂ и влажности не менее 80%.

2.3.2 Клонирование гибридом

Клонирование проводили методом предельного (лимитирующего) разведения в 96-луночных планшетах. Для этого 1-2 мкл суспензии гибридомных клеток из лунки 96-луночного планшета разводили в 10 мл гибридомной среды и вносили в лунки 96-луночного планшета, содержащего питающие (фидерные) клетки.

2.3.3 Получение иммуноасцитических жидкостей, содержащих МКА

Иммуноасцитическую жидкость, содержащую МКА, получали по мере ее накопления прижизненной чрескожной пункцией передней брюшной стенки мышей BALB/c после внутрибрюшинной инокуляции $1,2-2,0 \times 10^6$ гибридных клеток. За 2-4 недели до опытов мышей праймировали минеральным маслом пристан по 0,5 мл на мышь.

После забора асцитической жидкости гибридомные клетки, содержащиеся в ней, осаждали центрифугированием при 800 об/мин в течение 10 минут. Супернатант со

специфическими МКА использовали для постановки иммунохимических реакций. В клеточный осадок для разрушения эритроцитов добавляли 0,83 % раствор NH_4Cl и вновь осаждали при 800 об/мин в течение 10 минут. Выделенные таким образом гибридные клетки вводили внутрибрюшинно мышам для развития асцитной опухоли или подвергали замораживанию.

2.3.4 Криоконсервация гибридом

К осадку гибридных клеток добавляли нормальную лошадиную сыворотку из расчета 0,9 мл сыворотки на 1 пробирку, осадок ресуспендировали и переносили в заранее подготовленные стерильные пластиковые пробирки. После этого в каждую пробирку добавляли 0,1 мл диметилсульфоксида, содержимое аккуратно перемешивали, плотно закрывали завинчивающимися крышками. Предназначенные для криоконсервации пробирки закладывали в криосоломины, которые помещали в криобиологический сосуд с жидким азотом. После добавления в пробирку ДМСО все последующие, до погружения на 2-3 часа в пары азота и далее в жидкий азот, манипуляции проводили максимально быстро.

2.4 Методы по получению и характеристике иммуноглобулинов

2.4.1 Выделение иммуноглобулинов

Выделение иммуноглобулиновой фракции осуществляли двукратным осаждением раствором сульфата аммония до 45-50 % насыщения. Для этого асцитическую жидкость после центрифугирования разводили в 2 раза дистиллированной водой и проводили первое насыщение раствором сульфата аммония до 45 %, оставляли на ночь при температуре 4 °С. На следующий день после центрифугирования проводили второе насыщение раствором сульфата аммония до 50 %, также оставляли на ночь при температуре 4 °С. Освобождение иммуноглобулиновой фракции от сернокислого аммония проводили с помощью диализа против фосфатно-солевого буфера.

2.4.2 Электрофорез в полиакриламидном геле

Полученные иммуноглобулины оценивали электрофоретически по методу Laemmly U.K. [146] в 12,5 % полиакриламидном геле (PAAG) с SDS. К исследуемому препарату антител добавляли равный объем 2-кратного разделяющего буфера, содержащего 0,125 Моль Трис-НСl, 20 % глицина, 10 % 2-меркаптоэтанола и 4 % SDS, pH 8,3. Образцы нагревали на водяной бане в течение 2 минут при температуре 100 °С, после чего добавляли 0,1 % раствор бромфенолового синего в качестве лидирующего красителя. В качестве маркеров использовали набор маркеров разных молекулярных масс PageRuler Prstained Protein Ladder (ThermoScientific, США), от 15 до 170 кДа. Электрофорез проводили при pH 8,3 в буфере, содержащем 25 мМ Трис, 0,192 мМ глицина и 0,01 % SDS, при силе тока 20 мА в 4 % концентрирующем геле и 40 мА в 12,5 % разделяющем геле при напряжении 120 В до достижения фракциями нижней границы геля. Для окрашивания белков гель помещали в 0,125 % раствор кумасси в 50 % этаноле и 10 % уксусной кислоте на 12-18 ч, а затем в тот же раствор без красителя для обесцвечивания на 3 ч.

2.4.3 Определение концентрации белка

Определение концентрации белка осуществляли по Варбургу и Кристиану [70]. Выделенные и очищенные иммуноглобулины разводили 1/100. На спектрофотометре измеряли оптическую плотность (D) раствора при 260 и 280 нм. Концентрацию белка в растворе определяли по формуле:

$$C = 1,55 \times D_{280} - 0,76 \times D_{260},$$

где C – концентрация белка в мг/мл,

D_{280} – оптическая плотность при 280 нм,

D_{260} – оптическая плотность при 260 нм.

2.4.4 Изотипирование иммуноглобулинов

Изотипирование иммуноглобулинов проводили с помощью набора «Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents» (Sigma, США). Работу выполняли в соответствии с инструкцией к набору.

2.4.5 Определение константы аффинности

Константу аффинности МКА определяли по методу Битти [85].

2.4.6 Определение индекса аддитивности (эпитопный анализ)

Эпитопную направленность МКА определяли по Зайденову В.А. с соавт. [27] с определением индекса аддитивности (ИА) пары МКА [118].

Для этого в 3 лунки 96-луночного планшета сорбировали ХТ в концентрации 20 мкг/мл. В 1 лунку вносили МКА одного типа, во 2 – МКА второго типа, в 3 – оба МКА. После трехкратной отмывки вносили антивидовой конъюгат «Антитела диагностические против Ig G (H+L) белой мыши, меченных пероксидазой» в рабочем разведении (ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия), инкубировали 1 час, 6 раз отмывали и вносили субстратную смесь. Индекс аддитивности определяли по формуле:

$$ИА = 2A_{1+2}/(A_1+A_2) - 1$$

где ИА – индекс аддитивности;

A_1 – оптическая плотность при инкубировании с первыми МКА;

A_2 – оптическая плотность при инкубировании со вторыми МКА;

A_{1+2} – оптическая плотность при совместной инкубации обоих МКА.

МКА, направленные к одному эпитопу, конкурируют между собой за сайт связывания при совместном инкубировании. Индекс аддитивности при этом имеет наименьшее значение, близкое к нулю. МКА, направленные к разным антигенным детерминантам, связываются с различными эпитопами, не препятствуя присоединению других МКА, в результате чего оптическая плотность в лунке при совместной инкубации МКА выше, чем при инкубировании МКА по отдельности. Индекс аддитивности имеет наибольшее значение, близкое к 1.

2.4.7 Получение конъюгата иммуноглобулинов с пероксидазой хрена

Конъюгаты получали методом периодатного окисления пероксидазы из хрена [202] с незначительными модификациями, сохраняя основные пропорции компонентов. Фермент в количестве 4 мг растворяли в 1 мл дистиллированной воды, добавляли 0,2 мл 0,1 М свежеприготовленного раствора периодата натрия. Активацию проводили при постоянном встряхивании при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут, с последующим диализом против дистиллированной воды 18 часов при 4 °С. Активированную пероксидазу вносили в раствор МКА (10 мг/мл), поддерживая рН на уровне 9,0-9,5, добавляя 0,5 М карбонат-бикарбонатный буфер. Через 2 ч для стабилизации конъюгата добавляли 0,2 мл свежеприготовленного раствора боргидрида натрия в концентрации 2 мг/мл. Инкубирование проводили в течение 2 часов при 4 °С с последующим диализом смеси против ФСБ 18 часов при 4 °С. После диализа конъюгаты разводили глицерином в соотношении 1:1 и хранили при минус 20 °С.

2.5 Методы иммуноанализа

Скрининг МКА, секретируемых гибридами, определение специфичности иммуноглобулинов, чувствительности МКА, а также титра антител в сыворотке крови иммунных животных, в культуральной и асцитической жидкостях, активности выделенных иммуноглобулинов и меченных пероксидазой проводили в ТИФА.

2.5.1 Непрямой вариант ИФА

В лунки 96-луночного планшета для постановки ИФА вносили по 100 мкл антигена (ХТ в концентрации 10 мкг/мл). Сорбцию антигена в лунках проводили при температуре 37 °С в течение 2 часов или при температуре 4 °С в течение 18 часов. Свободные участки связывания блокировали 0,5 % раствором лактальбумина в ФСБ. Блокирующий раствор вносили по 150 мкл на лунку и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут. Планшеты отмывали трехкратно от несвязавшегося белка ФСБ по 200 мкл на лунку. Затем в лунки вносили антитела (сыворотку крови иммунных мышей, культуральную жидкость при культивировании гибридом, асцитическую

жидкость, выделенные иммуноглобулины). При определении их активности антителосодержащую пробу титровали двукратно в ФСБ по 100 мкл. При определении специфичности и чувствительности МКА, а также при первичном тестировании культуральной жидкости пробы вносили в одном разведении. Инкубирование с антителами проводили при температуре 37 °С в течение 1 часа. После трехкратной отмывки в лунки вносили по 100 мкл раствора конъюгата в соответствующем буфере (0,5 % лактальбумин в ФСБ и 0,5 % твин 20 в ФСБ в соотношении 9:1) в рабочем разведении 1:1000. В качестве конъюгата использовали антитела диагностические против иммуноглобулинов класса G мыши, меченные пероксидазой хрена. Планшеты инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 часа. После шестикратной отмывки ФСБ в лунки вносили по 100 мкл субстратной смеси (0,0223 % АВТS в 0,05 М цитратном буфере рН 4,0 с добавлением 0,0132 % H₂O₂) и инкубировали в течение 30 минут при постоянном встряхивании. В качестве отрицательного контроля использовали лунки, не содержащие антитела. В качестве положительного контроля использовали специфические к соответствующим антигенам антитела.

Реакцию учитывали визуально или фотометрически по изменению окраски в лунках. Появление зеленого окрашивания в опытных лунках при его отсутствии в контрольных свидетельствовало о положительной реакции. При фотометрическом учете результатов проба считалась положительной, если ее оптическая плотность в 2 и более раз превосходила ОП отрицательных контролей (вместо антителсодержащих проб вносили ФСБ).

2.5.2 Прямой вариант ИФА

С помощью прямого варианта ИФА определяли активность полученных конъюгатов. Этапы сорбции и блокировки планшетов проводили описанным выше способом для непрямого варианта ИФА. Затем вносили МКА, меченные пероксидазой хрена, по 100 мкл на лунку в рабочем разведении в буфере для конъюгата. Планшеты инкубировали 1 час при температуре 37 °С с последующей шестикратной отмывкой ФСБ. Комплекс антиген-меченное антитело выявляли по окрашиванию субстрата, также как в п. 2.5.1.

2.5.3 «Сэндвич»-вариант ИФА

В лунки 96-луночного планшета вносили МКА в концентрации 10-30 мкг/мл, инкубировали 2 часа при температуре 37 °С или 18 часов при температуре 4 °С. После блокировки и трехкратной отмывки планшетов вносили материал, содержащий антиген – бульон АКІ, в котором культивировали холерные вибрионы для индукции ХТ (п. 2.2.2) или ХТ, концентрация которого варьировала от 0,005 нг/мл до 10 мкг/мл. Инкубацию с антигеном проводили 1 час при температуре 37 °С. После трехкратной отмывки вносили специфичные к ХТ МКА, меченные пероксидазой хрена. Комплекс антитело-антиген-меченное антитело выявляли по окрашиванию субстрата (п. 2.5.1). Особенности проведения анализа отражены в соответствующих главах диссертации.

2.5.4 Определение ХТ методом ELISE-GM1

Работу выполняли в соответствии с рекомендациями CDC [104].

В лунки 96-луночного планшета для постановки ИФА вносили по 100 мкл моносиалоганглиозида GM1 в концентрации 2 нг/мл и проводили сорбцию при температуре 37 °С в течении 2 часов или при температуре 4 °С в течение 18 часов. Свободные участки связывания блокировали 0,5 % раствором лактальбумина в ФСБ. Блокирующий раствор вносили по 150 мкл на лунку и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут. Планшеты отмывали трехкратно от несвязавшегося белка ФСБ по 200 мкл на лунку. Затем в лунки вносили бульонную культуру, которую культивировали согласно п. 2.2.2. Инкубирование проводили при температуре 37 °С в течение 1 час. После трехкратной отмывки в лунки вносили по 100 мкл антиэнтеротоксической сыворотки, после инкубации и очередной трехкратной отмывки вносили антивидовые антитела, меченные пероксидазой хрена (0,5 % лактальбумин в ФСБ и 0,5 % твин 20 в ФСБ в соотношении 9:1) в рабочем разведении 1:1000. Планшеты инкубировали при 37 °С 1 час. После шестикратной отмывки ФСБ в лунки вносили по 100 мкл субстратной смеси. Учет результатов проводили также как в п. 2.5.1.

2.6 Статистическая обработка полученных данных

Процент неспецифических и специфических реакций, а также средние ошибки к ним вычисляли по формуле, представленной в работе Ашмарина И. П., Воробьева А. А. [6].

Глава 3 Получение моноклональных антител, специфичных к холерному токсину

Согласно принятой схеме лабораторной диагностики холеры для определения эпидемической значимости холерных вибрионов используется ряд методических подходов: определение гемолитической активности в пробе Грейга, чувствительности к холерным диагностическим бактериофагам ctx^- и ctx^+ , выявление холерогенного эффекта на биологической модели (крольчата-сосунки), обнаружение $ctxAB$ и $tcpA$ генов методом полимеразной цепной реакции [41, 62].

Однако постановка биологической пробы трудоемка и продолжительна по времени, применение бактериофагов затруднительно вследствие увеличения в последние годы количества штаммов вибрионов резистентных к ним. Определение генов, кодирующих синтез энтеротоксина, не всегда указывает на наличие экспрессии самого токсина. Поэтому разработка и совершенствование методов выявления холерного токсина *in vitro* до сих пор остается актуальной.

Среди наиболее перспективных подходов в этом направлении является иммуноферментный анализ (ИФА). Лабораториями ВОЗ и CDC предложена методика определения холерного токсина в иммуноферментном анализе, где в качестве связывающего лиганда выступают GM1-ганглиозиды [101]. В значительной степени упростить и снизить себестоимость иммуноферментного анализа для выявления холерного токсина позволит использование моноклональных антител, специфичных к данному токсину.

3.1 Разработка эффективной схемы иммунного ответа для синтеза мышинных холерных антитоксических антител

При получении гибридом одним из ключевых моментов является подбор оптимальной схемы иммунизации животных, обеспечивающей пролиферацию максимального количества иммунокомпетентных спленоцитов, вследствие чего повышается вероятность выделения гибридомы, продуцирующей специфические МКА, и стимулируется процесс дифференциации В-клеток, которые, в свою очередь, более активно участвуют в гибридизации. О степени иммунокомпетентности лимфоцитов при

получении гибридом, как правило, судят по величине титров специфических антител в сыворотке крови иммунизированных мышей.

Известно, что ХТ обладает выраженными антигенными свойствами, при этом он токсичен и при парентеральном введении в высоких дозах может вызывать гибель мышей BALB/c. В одной из относительно недавних работ по получению гибридом-продуцентов моноклональных антител к ХТ Петровой Е.Э. с соавт. [60] предложена наиболее удачная, на наш взгляд, схема иммунизации мышей ХТ в подушечки задних лапок с неполным адьювантом Фрейнда в дозе 10 мкг/мышь с последующей ревакцинацией через 2 недели такой же дозой токсина. При использовании мышей конвенциональной категории иммунизация осуществлялась трижды с интервалом в 2 недели дозами токсина: 2,5; 5 и 20 мкг/мл. Указанная схема иммунизации обеспечивала высокие значения титров специфических антител в сыворотке крови мышей (1:14000) и показатели эффективности получения гибридом, стабильно продуцирующих антитела в высоких титрах *in vitro* (1:20000) и *in vivo* (1:2000000).

С целью индукции повышенного антителообразования в сыворотке крови мышей нами была проведена 5-кратная иммунизация различными дозами токсина с использованием полного адьюванта Фрейнда и без него через 1 – 2 недели, а также 3 дня (таблица 3). Иммунизацию осуществляли как подкожно, так и внутрибрюшинно.

Таблица 3 Схемы иммунизации мышей инбредной линии BALB/c препаратом ХТ

| NN п/п | Кратность и метод введения | Доза, мкг/мышь | Интервал между введениями препарата ХТ | Значения титров антител |
|-----------|---|-------------------------|---|-------------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1. | 5-кратно 1-я иммунизация п/к, последующие в/б | 2мкг/мл+ПАФ 4 мкг/мл | 2 недели | 1/1280 |
| 2. | 5-кратно 1-я иммунизация п/к, последующие в/б | 2мкг/мл+ПАФ 4 мкг/мл | 1 неделя | 1/2560 |

Продолжение таблицы 3

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|---|---------------------|----------|---------|
| 3. | 5-кратно 1-я иммунизация п/к, последующие в/б | 2мкг/мл 4 мкг/мл | 1 неделя | 1/2560 |
| 4. | 5-кратно в/б | 2 мкг/мл | 3 дня | 1/10240 |
| Примечание: п/к – подкожно; в/б – внутривенно; ПАФ – полный адъювант Фрейнда | | | | |

Увеличение кратности иммунизации с интервалом в 1-2 недели не привело к повышению титра специфических антител более чем 1:2560. На выработку антител не влияло применение адъюванта и дозы токсина для первичной иммунизации (2 мкг/мл) и последующих прививок (4 мкг/мл). Близкое значение по уровню образования специфических антител в сыворотке крови мышей в сравнении с полученными Петровой Е.Э. с соавт. [60] наблюдалось при 5-кратной иммунизации ХТ в дозе 2 мкг/мл внутривенно с интервалом в 3 дня – титр 1:10240. Использование данной схемы иммунизации позволило добиться достаточно высокого уровня антителобразования у мышей BALB/c для получения гибридом, но за более короткий срок – 2 недели вместо 6 недель по схеме Петровой Е.Э. с соавт. [60].

Для последующих исследований была выбрана именно эта схема иммунизации. Особи с наибольшим титром антител отбирали для получения гибридом-продуцентов МКА, специфичных к ХТ.

3.2 Оптимизация процедуры гибридизации миеломных клеток и спленоцитов сингенных мышей

Один из главных этапов получения гибридом-продуцентов МКА является гибридизация спленоцитов гипериммунных мышей BALB/c с миеломными клетками Sp.2/0-Ag.8, дефектными по синтезу фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе (ГГФРТ⁻) [31]. Важно учитывать, что в процессе слияния принимают участие клетки, находящиеся в стадии экспоненциального роста. Для этого

миеломные клетки выращивают в среде с повышенным содержанием фетальной сыворотки, либо гибридизацию осуществляют в день выделения миеломных клеток из асцитической жидкости, что позволяет избежать дрожжевой контаминации.

Для стимуляции роста максимального количества клонов В-лимфоцитов – продуцентов специфических антител за два дня до слияния осуществляли бустерную прививку, а также подготавливали 96-луночные планшеты с фидерным слоем клеток, обеспечивающих повышение жизнеспособности гибридом и интенсификацию образования колоний за счет синтеза факторов, увеличивающих пролиферативную активность гибридом. Количество жизнеспособных гибридом после фузии зависит от соотношения клеток-партнеров при проведении гибридизации, которое может варьировать от 1:1 до 1:10 [2, 30, 31]. В ходе ряда экспериментов установлено, что наиболее оптимальным, в нашем случае, является соотношение миеломных клеток и спленоцитов 1:5 (таблица 4).

Таблица 4 Эффективность гибридизации при разном соотношении клеток миеломы и спленоцитов

| Соотношение миеломных клеток и спленоцитов | Эффективность гибридизации, %±m |
|--|---------------------------------|
| 1:1 | 12±0,5 |
| 1:2 | 56±0,4 |
| 1:5 | 84±0,5 |
| 1:10 | 70±0,5 |

Как более эффективный, химически чистый и безопасный индуктор слияния, был использован ПЭГ с молекулярной массой 4000 Да. Гибридизацию иммунных спленоцитов с миеломными клетками выполняли согласно п. 2.3.1 (материалы и методы). В качестве доноров иммунных спленоцитов и для культивирования гибридом *in vivo* использовали самок 8-12-недельных мышей, *in vitro* использовали селективную НАТ-среду [5, 15, 31, 44].

В результате исследования показано, что эффективность гибридизации составила 84±0,5 %. Через 5-7 дней в инвертированном микроскопе наблюдали появление клонов гибридных клеток. Начиная с 14 дня после слияния, культивирование гибридом осуществляли на среде с гипоксантином, тимидином (НТ), а еще через 5-7 дней их переводили на ростовую среду без селективных компонентов. Отбор гибридом-

продуцентов МКА к холерному токсину начинали после заполнения растущими клонами более половины лунки культуральных планшетов, исследуя культуральную жидкость в каждой из них в иммуоферментном анализе (первичный скрининг).

3.3 Создание клонотеки стабильных антителопродуцирующих гибридом

По результатам первичного скрининга было отобрано 30 % лунок с растущими гибридомами, в культуральной жидкости которых регистрировалась детектируемая позитивная реакция (ОП превышала отрицательный контроль в 2 и более раз). Гибридомы с максимальными и стабильно регистрируемыми значениями ОП в среде культивирования использовали для проведения клонирования методом лимитирующих разведений. После двух реклонирований в качестве перспективных отобрано 5 клонов: 1D5, 2E5, 3E5, 3D3, 3C4. Гибридомы обеспечивали образование иммуоасцитической жидкости в количестве от $6,5 \pm 0,7$ мл до $7,5 \pm 0,5$ мл на 9 – 10 день (таблица 5).

Таблица 5 Характеристика гибридом при культивировании *in vivo*

| Параметр | Клон гибридомы | | | | |
|---|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 1D5 | 2E5 | 3E5 | 3D3 | 3C4 |
| Сроки забора ИАЖ, день | $10 \pm 0,5$ | $9 \pm 0,6$ | $10 \pm 0,5$ | $10 \pm 0,5$ | $9 \pm 0,6$ |
| Объем ИАЖ, мл | $7,5 \pm 0,5$ | $6,5 \pm 0,7$ | $7,5 \pm 0,4$ | $7,0 \pm 0,2$ | $6,6 \pm 0,5$ |
| Количество клеток в 1 мл ИАЖ, $n \times 10^6$ | $7,0 \pm 0,6$ | $7,6 \pm 0,4$ | $7,0 \pm 0,4$ | $8,2 \pm 0,6$ | $7,8 \pm 0,2$ |
| Специфическая активность к ХТ | 1:25600 | 1:51200 | 1:51200 | 1:25600 | 1:25600 |
| Примечание: ИАЖ – иммуоасцитическая жидкость | | | | | |

Гибридомы характеризовались высокой стабильностью в течении IX пассажей *in vivo* (таблица 6).

Таблица 6 Активность асцитических жидкостей, продуцируемых полученными гибридами, в непрямом варианте ИФА

| Клон гибридомы Пассажи | 1D5 | 2E5 | 3E5 | 3D3 | 3C4 |
|---------------------------|--------------|----------|----------|---------|---------|
| | Титр антител | | | | |
| I | 1:25600 | 1:51200 | 1:51200 | 1:25600 | 1:25600 |
| II | 1:25600 | 1:51200 | 1:25600 | 1:25600 | 1:25600 |
| III | 1:25600 | 1:51200 | 1:25600 | 1:25600 | 1:25600 |
| IV | 1:6400 | 1:51200 | 1:51200 | 1:25600 | 1:6400 |
| V | 1:25600 | 1:51200 | 1:51200 | 1:6400 | 1:25600 |
| VI | 1:25600 | 1:102400 | 1:51200 | 1:6400 | 1:25600 |
| VII | 1:25600 | 1:51200 | 1:102400 | 1:25600 | 1:25600 |
| VIII | 1:25600 | 1:102400 | 1:102400 | 1:25600 | 1:25600 |
| IX | 1:25600 | 1:102400 | 1:102400 | 1:25600 | 1:25600 |

Как видно из данных таблицы активность асцитической жидкости, образуемой клонами 2E5 и 3E5, сохранялась на высоком уровне в течение всех девяти пассажей, а в ряде случаев после V пассажа отмечалось ее увеличение. В то же время для остальных гибридом этот показатель был существенно ниже.

Продукция МКА в культуральной среде, полученными гибридами, также отличалась у разных клонов (таблица 7).

Таблица 7 Количество МКА, продуцируемых клонами 1D5, 2E5, 3E5, 3D3, 3C4 *in vitro*

| Клон гибридомы Пассажи | 1D5 | 2E5 | 3E5 | 3D3 | 3C4 |
|---------------------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | Количество МКА, мкг/мл | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| I | 10 | 12 | 10 | 10 | 9 |
| II | 10 | 12 | 13 | 14 | 12 |
| III | 11 | 20 | 27 | 14 | 14 |

Продолжение таблицы 7

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|----|----|----|----|----|
| IV | 14 | 34 | 35 | 20 | 15 |
| V | 12 | 42 | 40 | 23 | 12 |
| VI | 13 | 40 | 33 | 19 | 13 |
| VII | 16 | 41 | 40 | 21 | 17 |
| VIII | 14 | 39 | 39 | 22 | 15 |
| IX | 15 | 42 | 40 | 20 | 16 |

Наибольшее количество МКА продуцировали гибридомы 2Е5 и 3Е5, которые как уже было показано ранее, обеспечивали образование асцитической жидкости с высокой активностью в отношении ХТ. Уровень продукции антител для этих клонов, начиная с V пассажа, был не ниже 33 мкг/мл. Для оставшихся гибридом этот показатель составил не более 16-23 мкг/мл и практически не изменялся в зависимости от количества пассажей.

Для оценки стабильности полученных гибридом при хранении, их подвергали замораживанию в жидком азоте при температуре минус 196 °С (п. 2.3.4) с последующей экспозицией в течение 3-6 месяцев. Установлено, что активность ИАЖ гибридных линий после размораживания сохранялась на прежнем уровне после заражения ими мышей BALB/c, равно как и при культивировании в гибридомной среде в условиях *in vitro*.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о перспективности использования полученных антителопродуцирующих гибридом в технологической разработке иммуноферментной тест-системы для выявления ХТ.

3.4 Характеристика полученных моноклональных антител

Выделенные моноклональные антитела оценивали по изотипу, аффинности, специфичности, аддитивности (эпитопности). Работу выполняли в соответствии с п. 2.4.4.-2.4.6 (материалы и методы).

В ходе ряда экспериментов установлено, что все изученные МКА относились к классу IgG трех субклассов (таблица 8). Два клона продуцировали IgG1, 2 клона – IgG2a, 1 клон – IgG3. Значения константы аффинности варьировало от $0,53 \times 10^9$ до $2,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, что указывает на высокую степень связывания антител с В-субъединицей ХТ.

Таблица 8 Изотип и аффинность МКА к ХТ

| № | МКА | Тип тяжелой цепи | $K_{афф} 10^9 \text{ M}^{-1}$ | ОПср(К-)×2 В-суб-цы | ОПср В-суб-ца |
|----|-----|------------------|-------------------------------|---------------------|---------------|
| 1. | 1D5 | IgG2a | $0,53 \pm 0,04$ | 0,106 | 0,963 |
| 2. | 2E5 | IgG1 | $2,0 \pm 0,10$ | 0,106 | 1,153 |
| 3. | 3E5 | IgG2a | $1,8 \pm 0,10$ | 0,106 | 1,503 |
| 4. | 3D3 | IgG1 | $1,4 \pm 0,10$ | 0,106 | 1,002 |
| 5. | 3C4 | IgG3 | $0,74 \pm 0,04$ | 0,106 | 0,879 |

Примечание: МКА – моноклональные антитела
 $K_{афф}$ – константа аффинности
 ОПср(К-) – оптическая плотность отрицательного контроля, среднее значение
 ОПср В-суб-ца – оптическая плотность В-субъединицы, среднее значение

По данным электрофореза в 12,5% ПААГ-SDS выделенные МКА обладали высокой чистотой (рисунок 1).

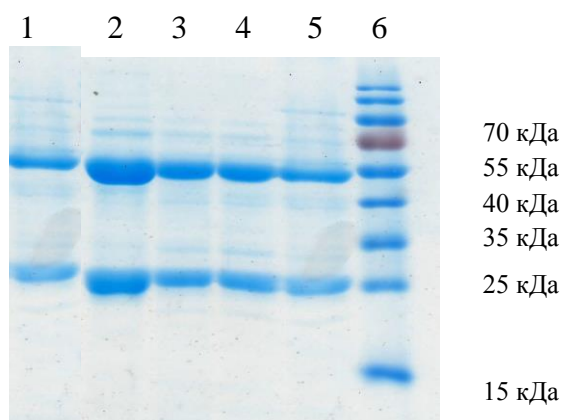


Рис. 1. Электрофореграмма МКА к ХТ в 12,5% ПААГ-SDS.

1-1D5, 2-2E5, 3-3E5, 4-3D3, 5-3C4, 6-маркеры молекулярной массы

Эпитопное картирование проводили методом прямого ИФА согласно п. 2.4.6 (таблица 9). Установлено, что МКА 1D5, 3D3 и 3C4 имеют схожую эпитопную направленность в отличии от МКА 2E5 и 3E5.

Таблица 9 Результаты эпитопного картирования полученных МКА

| | | | | | |
|-----|-----|------|------|------|------|
| МКА | 1D5 | 2E5 | 3E5 | 3D3 | 3C4 |
| 1D5 | 0 | 74,2 | 66,4 | 44,4 | 24,2 |
| 2E5 | | 0 | 99,6 | 70,1 | 81,4 |
| 3E5 | | | 0 | 56,5 | 66,4 |
| 3D3 | | | | 0 | 37,3 |
| 3C4 | | | | | 0 |

При постановке непрямого варианта ИФА, где лунки планшета сорбировали ХТ- и В-субъединицей ХТ в концентрации 10 мкг/мл, наблюдалось связывание всех пяти указанных выше МКА как с холерным токсином, так и с его В - субъединицей (Sigma, США).

При исследовании бульонных культур токсигенных штаммов *V.cholerae* O1 классического и эльтор биоваров и *V.cholerae* O139 серогруппы, в непрямом варианте ИФА с выделенными иммуноглобулинами во всех случаях наблюдался положительный результат (таблица 10)

Таблица 10 Идентификация токсигенных штаммов *V. cholerae* с использованием МКА в непрямом ИФА

| Штаммы | Тип холерного токсина | МКА | | | | |
|---|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1D5 | 2E5 | 3E5 | 3D3 | 3C4 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| <i>V. cholerae cholerae</i> 569 В, токсигенный | I | + | + | + | + | + |
| <i>V.cholerae cholerae</i> М-41, токсигенный | I | + | + | + | + | + |
| <i>V.cholerae eltor</i> Р-3122, токсигенный | II | + | + | + | + | + |
| <i>V.cholerae eltor</i> М-879, токсигенный | II | + | + | + | + | + |
| <i>V.cholerae eltor</i> М-1509, токсигенный, генетически измененный по <i>ctxB1</i> | I | + | + | + | + | + |
| <i>V.cholerae eltor</i> М-1463, токсигенный, генетически измененный по <i>ctxB1</i> | I | + | + | + | + | + |

Продолжение таблицы 10

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--|---|---|---|---|---|---|
| <i>V.cholerae</i> MO-45 O139 токсингенный | I | + | + | + | + | + |
| <i>V.cholerae eltor</i> M-1436, нетоксигенный | | - | - | - | - | - |
| <i>V.cholerae eltor</i> M-1460, нетоксигенный | | - | - | - | - | - |
| Примечание: “-” отрицательная реакция “+” положительная реакция | | | | | | |

При изучении бульонных культур нетоксигенных холерных вибрионов со всеми МКА в ИФА зарегистрирован отрицательный ответ.

Полученные результаты указывают на специфичность МКА к ХТ I и II типов и перспективность их использования для разработки иммуноферментной тест-системы.

Кроме этого, для оценки специфичности полученных МКА также использовали бульонные культуры *E. coli* O111 и других серогрупп, а также *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei spp.*, *Salmonella spp.*, *Y. enterocolitica* полученные по способу индукции ХТ в бульоне АКІ (п. 2.2.2), а также препарат термолабильного токсина кишечной палочки (LT), любезно предоставленный сотрудниками ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН г. Москва, имеющего более 80 % гомологии по аминокислотному составу с ХТ [99] и очищенный препарат ХТ, любезно предоставленный научным сотрудником РосНИПЧИ «Микроб», кандидатом биологических наук Захаровой Т.Л.

Бульонные супернатанты микроорганизмов и препараты ХТ и LT сорбировали в лунки планшета, осуществляли реакцию с полученными МКА, которые проявляли антивидовым конъюгатом (таблица 11).

Таблица 11 Специфичность МКА в ИФА

| Штаммы | МКА | | | | |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1D5 | 2E5 | 3E5 | 3D3 | 3C4 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| <i>Escherichia coli</i> O111-ВН-3133 | - | - | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> 18 | - | - | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> 1180 | - | - | - | - | - |
| <i>Salmonella paratyphi</i> A 27 | - | - | - | - | - |

Продолжение таблицы 11

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|---|---|---|---|---|
| <i>Salmonella paratyphi</i> B 61951 | - | - | - | - | - |
| <i>Salmonella typhi</i> 503 | - | - | - | - | - |
| <i>Salmonella typhimurium</i> 20 | - | - | - | - | - |
| <i>Shigella dysenteriae sonnei</i> 59097 | - | - | - | - | - |
| <i>Shigella dysenteriae sonnei</i> 58008 | - | - | - | - | - |
| <i>Shigella dysenteriae flexneri</i> 58848 | - | - | - | - | - |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> 96 | - | - | - | - | - |
| Холерный токсин | + | + | + | + | + |
| Термолабильный токсин <i>E. coli</i> (LT) | + | - | - | + | + |
| Примечание: “-” отрицательная реакция “+” положительная реакция | | | | | |

При исследовании бульонных культур гетерологичных микроорганизмов в непрямом варианте ИФА с полученными МКА во всех случаях отмечен отрицательный результат.

В то же время при взаимодействии с препаратом LT наблюдался положительный ответ с МКА, продуцируемыми гибридами 1D5, 3D3, 3C4, что указывает на перекрестную реактивность данных антител в отношении ХТ и LT.

Таким образом, нами получены пять гибридом, из которых две (2E5 и 3E5) продуцируют МКА специфичные к ХТ, и три (1D5, 3D3, 3C4) – МКА специфичные к ХТ и LT. Гибридомы характеризуются высокой стабильностью и активностью в течение IX пассажей *in vivo*.

Для последующих исследований по конструированию диагностической иммуноферментной тест-системы были использованы гибридомы 2E5 и 3E5, которые продуцируют до 40 мкг/мл МКА с высокой аффинностью в отношении ХТ и ориентированны к разным его эпитопам.

Глава 4 Разработка комплексного методического подхода для идентификации токсигенных штаммов холерного вибриона

При разработке иммуноферментных тест-систем для выявления и идентификации патогенных биологических агентов одним из наиболее перспективных подходов является «сэндвич»-вариант анализа, при котором в лунки планшета вносят антитела или другие молекулы, специфичные в отношении лиганда, а для выявления образовавшегося комплекса используют эти же или другие антитела, меченные пероксидазой хрена. Наличие ферментативной метки проявляется при добавлении соответствующего субстрата АВТS.

Именно такой вариант ИФА рекомендовал CDC [101] для определения ХТ. В качестве связывающего компонента в данном случае использованы GM1-ганглиозиды, а для проявления – сыворотка против ХТ и антивидовые иммуноглобулины, меченные пероксидазой хрена.

В предыдущей 3 главе нами охарактеризованы две гибридомы 2E5 и 3E5, продуцирующие МКА специфичные к ХТ. Данные МКА могут быть использованы в качестве связывающих и детектирующих агентов в «сэндвич»-варианте ИФА.

Важный этап определения холерного токсина включает в себя не только проведение ИФА для обнаружения токсина, но и этап его индукции у штаммов *V.cholerae* в условиях *in vitro*, который предусматривает культивирование вибрионов во флаконах, содержащих 200 мл среды АКІ, при постоянном покачивании. Выполнение такой процедуры трудоемко и продолжительно, а также связано с высоким риском образования аэрозоля в случае возникновения аварийной ситуации.

В связи с этим очевидна необходимость проведения исследований по двум направлениям: подбор оптимальных условий ИФА с применением МКА для детекции ХТ и разработка простого и быстрого способа индукции токсина *in vitro* штаммами холерных вибрионов.

4.1 Разработка ИФА с применением МКА для определения ХТ

Высокая чувствительность «сэндвич»-варианта ИФА напрямую связана с сорбционными свойствами подложки планшет для ИФА, на которой проводится анализ, и правильным выбором пары связывающих и детектирующих антител.

На первом этапе нашей работы была определена сорбционная активность МКА 2Е5 и 3Е5. Для этого ими сенсibilизировали лунки планшета (Медполимер) в концентрации от 10 до 50 мкг/мл в течение 2 ч при температуре 37 °С или 20 ч при температуре 4 °С. После блокировки лактальбумином вносили препарат ХТ в концентрации от 20 мкг/мл до 10 нг/мл с кратностью разведения в 2 раза. Образовавшийся комплекс проявляли с помощью коммерческой кроличьей сыворотки против ХТ [189] и антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена (таблица 11).

Установлено, что наилучший сорбционной способностью обладали МКА 3Е5. При содержании в лунке 10 мкг/мл данных антител удалось детектировать все взятые в исследования концентрации ХТ. При увеличении количества сорбированных иммуноглобулинов до 30 – 50 мкг/мл чувствительность анализа падала до 0,32 мкг/мл токсина. Возможно, что антитела, взятые в избытке, образовывали несколько слоев, которые при отмывках могли разрушаться и образовавшийся комплекс антиген-антитело удалялся из лунок планшета. Для МКА 2Е5 показатель сорбционной активности был несколько ниже: 20 мкг/мл. Чувствительность анализа в этом случае составила 0,08 мкг/мл. Все это указывает на перспективность использования МКА 3Е5 в качестве связывающих антител.

Далее нами была проведена работа по определению детектирующей способности МКА. Для этого на их основе готовили конъюгаты МКА с пероксидазой хрена. Работу выполняли в соответствии с п. 2.4.7. Лунки планшета сенсibilизировали ХТ в концентрации 100 нг/мл. После блокировки лактальбумином вносили полученные конъюгаты в разведениях от 1:50 до 1:102400 (таблица 12). Установлено, что активность конъюгата на основе МКА 3Е5 значительно выше (1:51200), чем на основе МКА 2Е5 (1:800).

Поскольку в «сэндвич»-варианте ИФА участвует пара антител нами была оценена эффективность выявления ХТ при использовании различных сочетаний антител 2Е5/2Е5*, 2Е5/3Е5*, 3Е5/3Е5*, 3Е5/2Е5* (связывающие/детектирующие).

Для этого лунки планшета сенсibilизировали МКА 2Е5 и 3Е5. После блокировки лактальбумином вносили ХТ в концентрации 100 нг/мл. Образовавшийся комплекс проявляли конъюгатами 2Е5* и 3Е5* в разведениях 1:800 и 1:51200 соответственно (таблица 13).

Таблица 11 Результаты определения оптимальной концентрации МКА для сенсibilизации планшетов

| МКА | Концентрация МКА, мкг/мл | ОПср (К-)×2 | Количество ХТ, мкг/мл; ОП ср | | | | | | | | | | | |
|-----|--------------------------|-------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | | | 20 | 10 | 5 | 2,5 | 1,25 | 0,63 | 0,32 | 0,16 | 0,08 | 0,04 | 0,02 | 0,01 |
| 2Е5 | 10 | 0,111 | 0,995 | 0,680 | 0,454 | 0,328 | 0,269 | 0,230 | 0,208 | 0,128 | 0,101 | 0,089 | 0,046 | 0,048 |
| | 20 | 0,110 | 1,095 | 0,580 | 0,432 | 0,367 | 0,284 | 0,262 | 0,247 | 0,189 | 0,175 | 0,088 | 0,046 | 0,047 |
| | 30 | 0,111 | 0,989 | 0,680 | 0,306 | 0,208 | 0,151 | 0,049 | 0,049 | 0,048 | 0,047 | 0,047 | 0,046 | 0,048 |
| | 40 | 0,111 | 1,087 | 0,564 | 0,210 | 0,099 | 0,044 | 0,045 | 0,047 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,047 | 0,047 |
| | 50 | 0,110 | 1,134 | 0,880 | 0,454 | 0,231 | 0,179 | 0,046 | 0,045 | 0,045 | 0,045 | 0,045 | 0,045 | 0,045 |
| 3Е5 | 10 | 0,113 | 2,287 | 1,980 | 1,583 | 1,072 | 0,607 | 0,416 | 0,348 | 0,297 | 0,250 | 0,217 | 0,182 | 0,149 |
| | 20 | 0,110 | 2,186 | 1,180 | 0,783 | 0,602 | 0,573 | 0,436 | 0,322 | 0,301 | 0,291 | 0,269 | 0,188 | 0,147 |
| | 30 | 0,112 | 2,083 | 1,207 | 0,656 | 0,372 | 0,274 | 0,196 | 0,168 | 0,095 | 0,060 | 0,059 | 0,047 | 0,045 |
| | 40 | 0,110 | 1,287 | 0,680 | 0,483 | 0,372 | 0,302 | 0,257 | 0,178 | 0,099 | 0,062 | 0,056 | 0,042 | 0,044 |
| | 50 | 0,112 | 2,473 | 1,239 | 0,683 | 0,372 | 0,287 | 0,191 | 0,164 | 0,109 | 0,068 | 0,0660 | 0,052 | 0,045 |

Примечание: МКА – моноклональные антитела
ОПср – оптическая плотность, среднее значение
ОПср(К-) – оптическая плотность отрицательного контроля, среднее значение

Таблица 12 Активность конъюгатов

| Конъюгаты | ОПср (К-)×2 | Разведения конъюгатов; ОП ср | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|----------|
| | | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 | 1:1600 | 1:3200 | 1:6400 | 1:12800 | 1:25600 | 1:51200 | 1:102400 |
| 2Е5 | 0,098 | 1,652 | 0,852 | 0,409 | 0,267 | 0,134 | 0,095 | 0,052 | 0,050 | 0,049 | 0,048 | 0,048 | 0,042 |
| 3Е5 | 0,098 | 2,293 | 2,162 | 1,987 | 1,647 | 1,285 | 0,861 | 0,562 | 0,412 | 0,319 | 0,216 | 0,167 | 0,088 |

Примечание: ОПср – оптическая плотность, среднее значение
ОПср(К-) – оптическая плотность отрицательного контроля, среднее значение

Таблица 13 Оценка эффективности разных сочетаний МКА (связывающие/детектирующие) в «сэндвич»-варианте ИФА

| МКА | ОПср (К-)×2 | Разведения конъюгатов; ОПср | | | | | | |
|----------|----------------|-----------------------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| | | 1:800 | 1:1600 | 1:3200 | 1:6400 | 1:12800 | 1:25600 | 1:51200 |
| 2E5/2E5* | 0,096 | 0,122 | 0,094 | 0,050 | 0,049 | 0,049 | 0,048 | 0,049 |
| 2E5/3E5* | 0,096 | 0,866 | 0,654 | 0,453 | 0,124 | 0,068 | 0,049 | 0,046 |
| 3E5/3E5* | 0,096 | 0,068 | 0,054 | 0,052 | 0,050 | 0,049 | 0,048 | 0,048 |
| 3E5/2E5* | 0,098 | 1,625 | 0,881 | 0,656 | 0,420 | 0,318 | 0,231 | 0,187 |

Примечание: МКА – моноклональные антитела
ОПср – оптическая плотность, среднее значение
ОПср(К-) – оптическая плотность отрицательного контроля, среднее значение

Исходя из полученных данных видно, что активность реакции при использовании в качестве связывающих антител 3E5, а детектирующих 2E5 выше, чем при обратном соотношении или когда используется только один тип антител. Поэтому для дальнейших исследований была выбрана следующая схема анализа: сорбция лунок планшета МКА 3E5 в концентрации 10 мкг/мл, проявление комплекса АГ-АТ с помощью конъюгата 2E5* в разведении 1:800 (0,28 мкг/мл иммуноглобулинов).

Все проведенные нами исследования были выполнены на планшетах Медполимер. Поэтому на следующем этапе работы оценена чувствительность ИФА по предложенной схеме с использованием планшетов и стрипов с повышенной сорбционной емкостью Costar (США) и Greiner bio-one (Германия). Тестирование проводили аналогичным образом как на планшетах Медполимер (Россия), используя разведения ХТ от 1,5 мкг/мл до 0,02 нг/мл (таблица 14).

Таблица 14 Сравнительный анализ чувствительности разработанной ИФА с применением МКА при использовании планшетов разных производителей

| Тип планшета | ОПср (К-)×2 | Количество ХТ, нг/мл; ОПср | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1,5 | 0,75 | 0,38 | 0,19 | 0,10 | 0,05 | 0,03 | 0,02 |
| Медполимер, Россия | 0,096 | 0,146 | 0,094 | 0,086 | 0,076 | 0,066 | 0,060 | 0,044 | 0,041 |
| Costar, США | 0,082 | 2,189 | 1,846 | 1,302 | 0,620 | 0,280 | 0,080 | 0,079 | 0,078 |
| Greiner Microlon, Германия | 0,080 | 0,864 | 0,559 | 0,303 | 0,157 | 0,079 | 0,078 | 0,076 | 0,076 |

Примечание: ОПср – оптическая плотность, среднее значение
ОПср(К-) – оптическая плотность отрицательного контроля, среднее значение

При использовании планшетов Costar (США) аналитическая чувствительность ИФА составила 0,1 нг/мл, что в 2 раза выше по сравнению с таковой на планшетах Greiner bio-one (Германия) и более чем в 10 раз выше – чем у Медполимер (Россия). Поэтому для последующих исследований были выбраны планшеты фирмы Costar (США).

Следует отметить, что чувствительность предложенной нами ИФА тест-системы (0,1 нг/мл) была значительно выше, чем у коммерческого препарата VET-RPLA detection hit (Oxoid) [199], используемого для выявления ХТ методом непрямой пассивной латексной агглютинации и обеспечивающий детекцию 1-2 нг/мл токсина. В то же время этот показатель был сопоставим с чувствительностью магноиммуноферментного анализа с применением МКА для определения ХТ и термостабильного токсина *E.coli* [131] и способом обнаружения данных токсинов (0,1 и 0,2 нг/мл, соответственно) с помощью «сэндвич» иммуноэнзимного анализа, предложенным Гришиным Е.В. и Валякиной Т.И. [17]. Полученные нами результаты послужили основанием для проведения следующего этапа работы по оценки эффективности сконструированной диагностической иммуноферментной тест-системы для выявления ХТ, индуцированного штаммами *V.cholerae* в бульонную среду АКІ.

В качестве тест-штаммов вибрионов были выбраны: токсигенные *V.cholerae* классического биовара 569В, М-41, токсигенные *V.cholerae* биовара эльтор Р-3122, М-879, М-1509, нетоксигенные *V.cholerae* биовара эльтор КМ-26 и *E.coli* O157. При этом штаммы холерных вибрионов биовара эльтор Р-3122 и М-879 относились к типичным представителям данного биовара и содержали *ctxB3* аллель, а штамм М-1509 – к генетически измененному варианту, несущему *ctxB1* аллель (ХТ I типа). Индукцию ХТ осуществляли в соответствии с рекомендациями CDC (п. 2.2.2). Для контроля использовали способ выявления ХТ методом ИФА с GM1-ганглиозидом (п. 2.5.4).

При исследовании бактериальных суспензий токсигенных штаммов *V.cholerae* 569В, М-41, Р-3122, М-879, М-1509 с помощью разработанного подхода во всех случаях получен положительный ответ, что указывает на способность продукции у данных штаммов холерного токсина (таблица 15).

Таблица 15 Результаты оценки эффективности выявления ХТ, индуцированного штаммами *V.cholerae in vitro* с помощью разработанного варианта ИФА с применением МКА 2Е5 и 3Е5

| Штаммы | Тип холерного токсина | ИФА экспер. | ELISA-GM1 |
|---|-----------------------|-------------|-----------|
| | | ОПср | |
| <i>V.cholerae cholerae</i> 569 В | I | 0,688 | 0,684 |
| <i>V.cholerae cholerae</i> М-41 | I | 0,120 | 0,181 |
| <i>V.cholerae eltor</i> М-1509 | I | 0,757 | 0,800 |
| <i>V.cholerae eltor</i> Р-3122 | II | 0,308 | 0,268 |
| <i>V.cholerae</i> М-879 | II | 0,258 | 0,258 |
| <i>V.cholerae</i> КМ-26 | - | 0,055 | 0,056 |
| <i>E.coli</i> О157 | - | 0,057 | 0,054 |
| ОПср(К+) | | 0,656 | 0,662 |
| ОПср(К-) | | 0,055 | 0,055 |
| Примечание: ОПср – оптическая плотность, среднее значение ОПср(К+) – оптическая плотность положительного контроля, среднее значение ОПср(К-) – оптическая плотность отрицательного контроля, среднее значение | | | |

В то же время при изучении нетоксигенной культуры *V.cholerae* КМ-26 и *E.coli* О157 зарегистрирован отрицательный результат, что подтверждает специфичность холерных антитоксических моноклональных антител. Представляет интерес тот факт, что по данным проведенного ИФА у штаммов холерных вибрионов классического биовара (569В и М-41) и генетически измененного варианта биовара эльтор (М-1509) выявлен практически одинаковый уровень продукции ХТ (по значению ОП). По сравнению с данными культурами у типичных изолятов вибрионов биовара эльтор (Р-3122, М-879) значения ОП в 6-12 раз меньше, что указывает на более низкий уровень экспрессии ХТ в условиях *in vitro*. Полученные результаты в полной мере согласуются с данными Задновой С.П. [26] и Шашковой А.В. [75] показавшими различия в продукции ХТ в условиях *in vitro* штаммами холерных вибрионов различных биоваров, несущих *ctxB1* и *ctxB3* аллели *ctxB* гена.

Таким образом, нами разработан «сэндвич»-вариант ИФА для определения ХТ с применением МКА 2Е5 и 3Е5, который обеспечивает высокую аналитическую чувствительность анализа – до 0,1 нг/мл при исследовании препарата токсина. Предложенный подход позволяет с одинаковой эффективностью детектировать ХТ у штаммов *V.cholerae* классического биовара и генетически измененных вариантов

биовара эльтор, несущему *ctxB1* аллель, продуцирующих в условиях *in vitro* большое количество токсина I типа, и типичных штаммов *V.cholerae eltor*, индукция токсина II типа у которых незначительна.

4.2 Совершенствование способа индукции ХТ штаммами холерных вибрионов *in vitro*

Как мы уже указывали ранее для определения ХТ *in vitro* у штаммов *V.cholerae* с помощью ИФА требуется их предварительное культивирование в среде АКІ для индукции токсина [101, 133].

Для этого культуру патогена первоначального засевают в объеме одной полной бактериальной петли № 2 в пробирку с 10 мл бульона АКІ (бакто-пептон - 1,5 %, дрожжевой экстракт - 0,4 %, натрия бикарбонат - 0,3 %, натрия хлорид - 0,5 %), инкубируют при температуре 30° С в течение 4 ч, а затем переносят содержимое пробирки в полном объеме во флакон с 250 мл бульона АКІ и инкубируют при постоянном помешивании в течение 18 часов при температуре 30 °С. Культивирование вибрионов по указанной схеме трудоемко, длительно (22 ч), осуществляется в большом объеме питательной среды при шуттелировании, что сопряжено с высоким риском образования аэрозоля в случае возникновения аварийной ситуации, поскольку в бульонной культуре уже через 5-6 ч содержится до 1×10^9 м.к./мл патогена. Для проведения исследования требуются дорогостоящие реагенты: GM1-ганглиозиды, поликлональная сыворотка против холерного токсина, антивидовые антитела, меченные пероксидазой.

В связи с этим нами был разработан более простой, быстрый, с дополнительными мерами снижения биологической опасности процесса, связанного с риском образования аэрозоля в случае аварийной ситуации, способ индукции ХТ штаммами холерных вибрионов *in vitro*.

Sanchez J. *et al.* [176] при изучении экспрессии ХТ штаммами разных биоваров в условиях *in vitro* показали, что на уровень продукции токсина в большей степени оказывает влияние увеличение поверхности среды культивирования, чем ее аэрация. Авторы после первичного подращивания холерных вибрионов в течение 4 ч в среде АКІ переносили бульонную культуру в количестве 200, 400, 600, 800 и 1600 мкл в пробирки

объемом 7,5 мл с возможностью создания анаэробной среды и продолжали инкубирование в течение 3 часов. Установлено, что замена воздушной смеси на азотную или геливую в пробирке для вторичного культивирования не влияло на выход ХТ, тогда как уменьшение объема среды приводило к увеличению количества продуцируемого ХТ и накоплению биомассы. Так, наибольший выход токсина наблюдался, когда культивирование осуществляли в 200 мкл, при этом высота столбика среды составляла 1,25 мм, а соотношение объема и площади среды – 0,13 мл/см². Аналогичные показатели характерны в случае подращивания в 3 мл среды АКІ в культуральных флаконах объемом 125 мл.

В связи с этим нами проведен ряд экспериментов по сравнительной оценке метода Iwanaga M. *et al.* [133], предусматривающего шугтирование *V.cholerae* при первичном и вторичном подращивании, эффективности индукции ХТ в культуральных флаконах объемами 50 см³ и 250 см³, разработанного CDC [101] и предложенных нами центрифужных палстиковых пробирках типа Falcon объемами 15 см³ и 50 см³, содержащих различное количество среды АКІ, без постоянного встряхивания (таблица 16). Культуральные флаконы и центрифужные пробирки располагали под углом наклона 5-10° так, чтобы питательная среда в пробирках не затрагивала крышку, помещали в термостат и проводили инкубирование при температуре 30 °С в течение 18 ч без постоянного покачивания. Для контроля параллельно индукцию ХТ осуществляли по методу Iwanaga M. *et al.* [133].

Таблица 16 Результаты определения продукции ХТ вибрионами при культивировании по Iwanaga M. *et al.* [133] и по экспериментальному подходу с помощью разработанного варианта ИФА с применением МКА 2Е5 и 3Е5

| Проба | Уровень продукции ХТ при вторичном подращивании в АКІ, ОП | | | | | | | |
|--|---|--|-------|--------------------|-------|-------|--|-------|
| | По Iwanaga M. <i>et al.</i> [133] | По CDC [101] | | | | | Экспериментальный метод | |
| | | Количество питательной среды в культуральном флаконе, мл | | | | | Кол-во питательной среды в центрифужных пробирках (объемом 50 см ³ и 15 см ³), мл | |
| | | объемом 250 см ³ | | 50 см ³ | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| <i>V. cholerae cholerae</i> 569В токсигенный | 2,164 | 2,155 | 2,160 | 2,144 | 2,161 | 2,162 | 2,164 | 2,164 |

Продолжение таблицы 16

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>V. cholerae eltor</i> P-3122 токсигенный | 0,373 | 0,384 | 0,353 | 0,371 | 0,367 | 0,372 | 0,393 | 0,361 |
| <i>V. cholerae eltor</i> M-1509 токсигенный | 2,310 | 2,210 | 2,311 | 2,320 | 2,289 | 2,300 | 2,331 | 2,323 |
| <i>V. cholerae eltor</i> M-879 токсигенный | 0,179 | 0,181 | 0,175 | 0,177 | 0,178 | 0,178 | 0,185 | 0,176 |
| <i>V. cholerae eltor</i> KM-26 нетоксигенный | 0,071 | 0,069 | 0,070 | 0,065 | 0,070 | 0,071 | 0,069 | 0,064 |
| <i>E. coli O157</i> | 0,055 | 0,053 | 0,052 | 0,054 | 0,056 | 0,054 | 0,052 | 0,054 |
| Отрицательный контроль | 0,042 | 0,045 | 0,044 | 0,040 | 0,041 | 0,044 | 0,041 | 0,042 |
| Положительный контроль | 1,451 | 1,389 | 1,450 | 1,461 | 1,398 | 1,396 | 1,409 | 1,432 |

Из представленных данных видно, что уровень продукции ХТ в среде АКІ при культивировании по Iwanaga M. *et al.* [133] и по предложенному способу в культуральных флаконах и центрифужных пробирках был одинаков. При этом на индукцию токсина не повлияло уменьшение количества среды АКІ в культуральных флаконах объемами 250 см³ и 50 см³ до 40 мл и 5 мл, соответственно, и в центрифужных пробирках типа Falcon объемами 50 см³ и 15 см³ до 10 мл и 5 мл, соответственно.

Для эффективной экспрессии ХТ вибрионами *in vitro* применение для вторичного подращивания центрифужных пробирок типа Falcon позволило получить максимально приближенные показатели по соотношению площади поверхности среды к ее объему и высоте столбика питательной среды как в случае использования культуральных флаконов объемом 50 см³ по Sanchez G. *et al.* [176].

В ходе ряда экспериментов установлены наиболее благоприятные условия вторичного подращивания холерных вибрионов в разных объемах среды АКІ для индукции ХТ (таблица 17).

Таблица 17 Условия подготовки пробирок для вторичного культивирования при индукции ХТ *in vitro*

| Тип пробирки | Объем бульона АКІ | Объем вносимой культуры после первичного подращивания |
|---|-------------------|---|
| Стеклянная пробирка П1-16-150 (ГОСТ 25336-82) | 3 мл | 0,6 мл |
| центрифужная 15 см ³ | 5 мл | 1,0 мл |
| центрифужная 50 см ³ | 10 мл | 2,0 мл |

На основании полученных результатов для дальнейших исследований была выбрана следующая схема анализа: первичный посев исследуемого штамма в стеклянную пробирку с 10 мл бульона АКІ, с последующим переносом 1 мл или 2 мл подращенной культуры в пластиковые центрифужные пробирки объемом 15 см³ или 50 см³, содержащие 5 мл или 10 мл бульона АКІ, соответственно.

С целью сокращения сроков исследования и их стандартизации варьировали продолжительность подращивания: первичного – от 2 до 4 часов, вторичного - от 16 до 18 часов, а также его температурные условия: 30 °С и 37 °С. Для работы было предложено 8 вариантов культивирования холерных вибрионов для индукции холерного токсина (таблица 18). Продукцию ХТ определяли с помощью разработанного варианта ИФА с МКА 2Е5 и 3Е5 (таблица 19).

Таблица 18 Варианты предварительного культивирования холерных вибрионов для индукции ХТ

| Вариант | Время первичного подращивания, ч | Время вторичного подращивания, ч | Температурный режим, °С |
|---------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| I | 4 | 18 | 30 |
| II | 2 | 18 | 30 |
| III | 4 | 16 | 30 |
| IV | 2 | 16 | 30 |
| V | 4 | 18 | 37 |
| VI | 2 | 18 | 37 |
| VII | 4 | 16 | 37 |
| VIII | 2 | 16 | 37 |

Таблица 19 Сравнительные результаты определения продукции ХТ у штаммов *V.cholerae* при разных условиях культивирования

| Характеристика штаммов | Варианты культивирования микроорганизмов*; Продукция ХТ ОПср. | | | | | | | |
|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII |
| <i>V. cholerae cholerae</i> 569В токсигенный | 2,152 | 2,172 | 2,180 | 2,170 | 2,159 | 2,160 | 2,159 | 2,164 |
| <i>V. cholerae cholerae</i> М-41 токсигенный | 2,202 | 2,182 | 2,246 | 2,192 | 2,202 | 2,129 | 2,202 | 2,220 |
| <i>V. cholerae eltor</i> Р-3122 токсигенный | 0,329 | 0,332 | 0,379 | 0,381 | 0,390 | 0,369 | 0,371 | 0,369 |
| <i>V. cholerae eltor</i> М-1509 токсигенный | 2,340 | 2,280 | 2,287 | 2,291 | 2,222 | 2,301 | 2,280 | 2,279 |
| <i>V. cholerae eltor</i> М-879 токсигенный | 2,184 | 2,185 | 2,180 | 2,178 | 2,168 | 2,178 | 2,181 | 2,188 |
| <i>V. cholerae eltor</i> КМ-26 нетоксигенный | 0,061 | 0,066 | 0,061 | 0,068 | 0,065 | 0,059 | 0,066 | 0,068 |
| <i>E. coli</i> О157 нетоксигенный | 0,055 | 0,044 | 0,050 | 0,053 | 0,051 | 0,048 | 0,054 | 0,050 |
| Отрицательный контроль | 0,042 | 0,040 | 0,041 | 0,041 | 0,043 | 0,041 | 0,042 | 0,040 |
| Положительный контроль | 1,439 | 1,399 | 1,420 | 1,450 | 1,423 | 1,409 | 1,448 | 1,444 |
| Примечание: *нумерация вариантов культивирования в соответствии с таблицей 18 ОПср – оптическая плотность, среднее значение | | | | | | | | |

Установлено, что уровень экспрессии холерного токсина тест-штаммами при использовании предложенной ранее схемы культивирования в центрифужных пробирках не изменился при сокращении продолжительности первичного и вторичного подрачивания с 4 ч до 2 ч и с 18 ч до 16 ч, соответственно, и выполнении анализа при температуре 37 °С.

В связи с этим оптимальным представляется следующая схема индукции ХТ вибрионами *in vitro*: посев агаровой культуры в стеклянную пробирку с 10 мл АКІ на 2,5 ч при температуре 37 °С (первичное подрачивание), далее пересев 1 мл или 2 мл подращенной культуры в пластиковую центрифужную пробирку с 5 мл или 10 мл АКІ, соответственно, расположение её в практически горизонтальном положении (без

касания жидкости крышки пробирки) под углом 5 до 10° и инкубации в термостате при температуре 37 °С в течение 16 часов (вторичное подраживание).

Таким образом, нами разработан «сэндвич»-вариант ИФА с применением МКА 2Е5 и 3Е5, позволяющей выявлять токсин, продуцируемый штаммами *V.cholerae* классического и эльтор биоваров, с чувствительностью – не менее 0,1 нг/мл. Предложенная схема выращивания холерных вибрионов в среде АКІ обеспечивает индукцию холерного токсина I и II типов за более короткий срок в одноразовых пластиковых центрифужных пробирках типа Falcon без использования большого объема питательной среды и шутирования, что снижает биологическую опасность процесса культивирования микроорганизмов II группы патогенности.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности создания диагностической иммуноферментной тест-системы для детекции холерного токсина с применением полученных нами холерных антитоксических моноклональных антител 2Е5 и 3Е5.

Глава 5 Конструирование иммуноферментной тест-системы для идентификации токсигенных штаммов холерного вибриона и определение ее диагностической ценности

При идентификации холерных вибрионов важное значение имеет определение их вирулентности и эпидемической значимости. Для этих целей широкое применение получили холерные диагностические бактериофаги ctx^- и ctx^+ , используются тесты по определению продукции гемолизина в пробе Грейга и холерного токсина на биологической модели. Не менее востребованным является ПЦР, направленная на выявление *ctxAB* и *tcpA* генов [41].

В настоящее время из-за изменчивости возбудителя холеры фагодиагностика нерезультативна. Выполнение биологической пробы трудоемко и продолжительно. Поэтому в последние годы приобретает актуальность разработка современных технически доступных и эффективных способов определения вирулентности патогена *in vitro*.

В процессе выполнения диссертационного исследования был разработан методический подход по выявлению ХТ, продуцируемого штаммами *V.cholerae*, с помощью «сэндвич» - варианта ИФА с применением МКА 2Е5 и 3Е5 (глава 4). Подобраны оптимальные условия индукции ХТ в среду АКІ в одноразовых центрифужных пробирках типа Falcon. Для внедрения предложенного способа в практику и его применения в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней необходимо создание и регистрация в установленном порядке диагностического препарата, включающего все реагенты, необходимые для осуществления анализа.

5.1 Комплектация иммуноферментной тест-системы, учет результатов

Комплектация твердофазной иммуноферментной тест-системы должна предусматривать наличие соответствующим образом активированной подложки (планшета или стрипов), конъюгата, представляющего собой антитела, меченные преоксидазой хрена или другой ферментативной меткой, и реагентов для приготовления буферов и субстратной смеси для проявления комплекса антиген-антитело.

В состав разработанной нами ранее «Тест-системы иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной (ИФАПестФ1-М)» вошли фосфатно-солевой буфер (ФСБ), лактальбумин, конъюгат пероксидазный иммуноглобулиновый чумной моноклональный (МКАФ1), глицерин, Tween-20, кислота лимонная, натрия цитрат, ABTS 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат), гидроперит, положительный контрольный образец (ПКО-ЧМ), планшет полистироловый для иммуноферментного анализа однократного применения, предварительно сорбированный моноклональными антителами. Такая форма комплектации обеспечивает проведение 92 исследований. Однако разведенные реагенты сохраняют активность в течение 3 суток. Этот довольно короткий срок использования тест-системы в полном объеме реально осуществим в процессе ее применения по основному назначению – эпизоотологического мониторинга чумы, когда количество проб за несколько дней может достигать указанного выше числа [22].

Объем исследований по определению продукции холерного токсина штаммами *V. cholerae* в эпидемически благополучный период значительно меньше. Так за 2006-2015 гг. на территориях Российской Федерации были изолированы из воды поверхностных водоемов 33 штамма *V. cholerae* O1 *ctxAB⁻ tcpA⁺* в Ростовской области (2007 и 2015 гг.), в республике Калмыкия (2007, 2011-2015 гг.), в Алтайском (2011 г.) и Хабаровском (2013 г.) краях и два штамма *V. cholerae* O1 биовара эльтор, *ctxAB⁺ tcpA⁺* (Ростовская область, 2011, 2014 гг.) [72].

Поэтому при разработке тест-системы «ИФАХолХТ-М» необходимо было учесть возможность проведения ограниченного количества анализов, например, в нескольких стрипах или с использованием целиком всего стрипованного 96-луночного планшета, если потребуется исследовать большое количество проб во время вспышек.

Для этих целей предпочтительнее стрипованные планшеты Costar, которые по результатам проведенных нами исследований (п. 4.1) обеспечивают высокую чувствительность разработанного варианта ИФА с применением МКА 2Е5 и 3Е5, а навески реагентов для подготовки рабочего разведения конъюгата (лактальбумин и Tween 20) и субстратной смеси (кислота лимонная, натрия цитрат, гидроперит) разделены на несколько частей (оптимальным является четыре), что позволяет осуществлять анализ на трех стрипах.

Однако, разделить навеску АВТС массой 0,0065 г на четыре пробирки не представляется возможным, поскольку это ниже минимального предела взвешивания аналитических весов. В связи с этим нами изучена возможность высушивания под вакуумом разведенного раствора АВТС. Для сушки готовили пробирки объемом 0,5 мл, содержащие 1,3 мг/мл АВТС в 50 мкл водного раствора. При разведении полученного высушенного препарата АВТС в 0,15 мл дистиллированной воды его количество будет соответствовать таковому при подготовки навески вещества, необходимой для проведения анализа на трех стрипах. Высокая стабильность отмечена и для полученного препарата АВТС, и планшетов для ИФА (Costar, США), сенсibilизированных МКА 3Е5 в концентрации 10 мкг/мл.

Транспортировка конъюгата и положительного контрольного образца, входящих в состав иммуноферментных тест-систем для лабораторной диагностики инфекционных болезней, последний из которых представляет в большинстве случаев разведенный препарат антигенов, должна осуществляться при низкой температуре минус 20 °С [67]. Для упрощения данной процедуры эти компоненты также могут быть высушены под вакуумом. Ранее при разработке иммуноферментных диагностических чумных и туляреминых тест-систем нами был получен положительный опыт по высушиванию пероксидазных конъюгатов и препарата контрольных образцов в микропробирках объемом 0,5 мл без крышек при температуре 4 °С в течение 2 – 4 часов, которые сохраняли исходную активность в течение 6 месяцев (срок наблюдения) при температуре хранения и транспортировки при температуре от 4 до 10 °С (в условиях холодильника) [22, 71].

При создании тест-системы «ИФАХолХТ-М» мы решили также использовать этот подход. Конъюгат 2Е5* в разведении 1:800 в количестве 0,05 мл высушивали и проводили ускоренную оценку его стабильности и активности через месяц хранения при температуре 37 °С, что по ГОСТ Р ЕН 13640-2010 [16] «Исследование стабильности реагентов для диагностики *in vitro*» соответствует его хранению при температуре 4 °С в течение 6 месяцев. Аналогичным образом проводили сушку препарата ХТ с концентрацией 20 нг/мл. Установлено, что изготовленные в сухой форме конъюгат и ХТ сохраняли свою активность после хранения в течение 1 месяца при температуре 37 °С на том же уровне, что и исходные жидкие образцы препаратов после хранения при температуре 4 °С в течение 6 месяцев.

Как нами уже отмечалось, для определения продукции ХТ токсигенными штаммами холерных вибрионов необходимо создание соответствующих условий для их культивирования в жидкой питательной среде АКІ. Исходя из оптимальных условий подрачивания вибрионов в бульоне АКІ, определенных нами ранее (п. 4.2), в комплект «ИФАХолХТ-М» должны входить две пробирки со средой АКІ, причем каждая из пробирок должна содержать: 7,5 г бактопептона («Becton Dickinson», США), 2 г дрожжевого экстракта («Becton Dickinson», США), 2,5 г натрия хлорида («НеваРеактив», Россия), 0,24 г гидрокарбоната натрия («НеваРеактив», Россия).

Таким образом, в результате проведенных исследований была разработана иммуноферментная тест-система «ИФАХолХТ-М», которая включала 12 компонентов (таблица 20).

Таблица 20 Комплектация «ИФАХолХТ-М»

| Компонент | Описание | Объем/масса | Количество |
|-----------|--|-------------|------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| № 1 | Навеска среды АКІ - порошок кремового цвета, после растворения - жидкость светло-желтого цвета | 12,12 г | 2 пробирки |
| № 2 | Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) - таблетка белого цвета, после растворения - жидкость прозрачного цвета | 1,01 г | 5 пакетов |
| № 3 | Молоко сухое обезжиренное (лактальбумин) - порошок кремового цвета, после растворения - жидкость белого цвета | 0,0113 г | 4 пробирки |
| № 4 | Конъюгат пероксидазный иммуноглобулиновый моноклональный (конъюгат МКАХТ) - аморфная масса белого цвета, представляющая собой высушенные моноклональные иммуноглобулины ХТ, конъюгированные с пероксидазой хрена, после растворения - жидкость желтого цвета | 0,02 мл | 1 пробирка |
| № 5 | Глицерин - вязкая прозрачная жидкость | 0,025 мл | 1 пробирка |
| № 6 | Tween-20 - вязкая слегка желтоватая жидкость | 0,002 мл | 4 пробирки |
| № 7 | Кислота лимонная - порошок белого цвета, после растворения - прозрачная жидкость | 0,0225 г | 4 пробирки |

Продолжение таблицы 20

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|------|---|------------|------------|
| № 8 | Натрия цитрат - порошок белого цвета, после растворения - прозрачная жидкость | 0,025 г | 4 пробирки |
| № 9 | ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), diammonium salt - порошок бледно-зеленого цвета, после растворения - жидкость бледно-зеленого цвета | 0,001625 г | 4 пробирки |
| № 10 | Гидроперит - порошок белого цвета, после растворения - прозрачная жидкость | 0,067 г | 4 пробирки |
| № 11 | Положительный контрольный образец (ПКО-ХТ) - аморфная масса белого цвета, представляющая собой высушенный холерный токсин в концентрации 200 нг, после растворения - жидкость прозрачного цвета | 0,1 мл | 4 пробирки |
| № 12 | Планшет 12 стрипов по 8 лунок полистироловый, для иммуноферментного анализа, однократного применения, обработанный. Лунки планшета прозрачные, без видимых следов вещества | 96 лунок | 1 шт. |

Схема проведения анализа при использовании представленной формы комплектации включает несколько основных этапов:

- приготовление среды для культивирования *V.cholerae*;
- приготовление рабочих растворов для проведения иммуноферментного анализа;
- проведение анализа;
- учет и интерпритация результатов.

Регистрацию результатов иммуноферментного анализа осуществляют с использованием мультифокального фотометра при длине волны 405 нм.

Результат анализа считают положительным, если $ОПобр \geq ОП(К-) \times 2$. Результат анализа считают отрицательным, если $ОПобр < ОПср(К-) \times 2$ ($ОПобр$ – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом).

Для учета результатов реакции используют приведенную ниже таблицу.

Таблица 21 Оценка результатов диагностической тест-системы «ИФАХолХТ-М»

| Образец (лунки планшета) | Регистрируемое значение ОП | Результат анализа |
|--|-------------------------------|--|
| Отрицательный контроль – ФСБ | $< 0,1$ | Результаты анализа подлежат учету. |
| | $\geq 0,1$ | Результаты анализа не подлежат учету. Ложноположительный результат. |
| Положительный контрольный образец «ПКО–ХТ» | $\geq \text{ОП}(К-) \times 3$ | Результаты анализа подлежат учету. |
| | $< \text{ОП}(К-) \times 3$ | Результаты анализа не подлежат учету. Ложноотрицательный результат. |
| Пробы | $< \text{ОП}(К-) \times 2$ | У исследуемых штаммов холерных вибрионов продукция холерного токсина не обнаружена. |
| | $\geq \text{ОП}(К-) \times 2$ | У исследуемых штаммов холерных вибрионов выявлена продукция холерного токсина. |

Компоненты медицинского изделия «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» по ТУ 9388-052-01898109-2015 упакованы таким образом, чтобы избежать потери их эксплуатационных свойств в результате внешнего воздействия во время транспортирования и хранения при соблюдении температурного режима. Групповая упаковка компонентов и стрипированных планшет для проведения ИФА обеспечивает подготовку рабочих растворов субстратной смеси, конъюгата и положительного контрольного образца на 3 стрипа или 12 стрипов в зависимости от количества исследуемых проб.

Маркировка представленных образцов МИ, в том числе его компонентов, удобна для восприятия потребителем и содержит всю необходимую информацию.

Тест-система укомплектована в полном объеме и позволяет выполнить исследование единичных образцов, так и одномоментно использовать весь планшет целиком с постановкой положительного (1 лунка) и отрицательного (1 лунка) контролей.

Стабильность изделия при эксплуатации в практической лаборатории сохраняется в течение срока годности при соблюдении условий хранения, что подтверждено нами

при исследовании стабильности, а также в процессе проведения клинических испытаний.

5.2 Оценка чувствительности и специфичности созданной тест-системы в рамках лабораторных испытаний

Исследования были проведены на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» с использованием препарата холерного токсина фирмы (Sigma, США), 27 штаммов *V.cholerae* и 3 штаммов *E.coli*, характеристика которых представлена в таблицах 1, 2.

Культивирование штаммов микроорганизмов проводили в соответствии с п.5.1, постановку ИФА – с п. 5.2.

В случае выявления продукции штаммами *V. cholerae* холерного токсина, данные культуры считали токсигенными, при отсутствии - нетоксигенными.

На первом этапе была определена чувствительность созданной тест-системы при исследовании различных концентраций ХТ. Использование пары разноэпитопных моноклональных антител позволило нам добиться довольно высокой пороговой чувствительности равной 0,1 нг/мл (таблица 22). Для сравнения этот показатель был выше, чем у препарата, разработанного Петровой Е.Э. с соавт.[60].

Результаты определения продукции ХТ штаммами *V. cholerae* в «сэндвич»-варианте иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител представлены в таблице 23. При исследовании штаммов холерных вибрионов и штаммов гетерологичных групп продукция холерного токсина была выявлена у 16 штаммов *V.cholerae* и отсутствовала у 9 нетоксигенных вариантов холерного вибриона, что соответствует их генетической характеристике.

Специфичность разработанной моноклональной диагностической холерной антитоксической тест-системы была также подтверждена при исследовании трех штаммов кишечной палочки.

Таблица 22 Результаты аналитической чувствительности экспериментальной моноклональной иммуноферментной холерной тест-системы для определения холерного токсина

| ОПср (К-)×2 | Количество холерного токсина, нг; ОПср | | | | | | | | | | Минимальное выявляемое количество препарата холерного токсина |
|---|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| | 25 | 12,5 | 6,25 | 3,125 | 1,56 | 0,78 | 0,39 | 0,2 | 0,1 | 0,05 | |
| 0,082 | 1,980 | 1,583 | 1,272 | 1,107 | 0,916 | 0,648 | 0,490 | 0,370 | 0,188 | 0,078 | 0,1 нг |
| Примечание: ОПср – оптическая плотность, среднее значение ОПср (К-) – оптическая плотность отрицательного контроля, среднее значение | | | | | | | | | | | |

Таблица 23 Результаты определения продукции *in vitro* ХТ, продуцируемого клетками *V.cholerae*, в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител

| № | Наименование штаммов | Генетическая характеристика | ОПср образцов | Результат |
|-----|----------------------------------|--|---------------|--------------------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1. | <i>V.cholerae</i> 569 В | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 2,164 | выявлена продукция холерного токсина |
| 2. | <i>V.cholerae</i> М-41 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 2,225 | выявлена продукция холерного токсина |
| 3. | <i>V. cholerae eltor</i> Р-3122 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 0,373 | выявлена продукция холерного токсина |
| 4. | <i>V. cholerae eltor</i> М-879 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 0,179 | выявлена продукция холерного токсина |
| 5. | <i>V. cholerae eltor</i> М-1509 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 2,310 | выявлена продукция холерного токсина |
| 6. | <i>V. cholerae eltor</i> Р-18899 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 2,285 | выявлена продукция холерного токсина |
| 7. | <i>V. cholerae eltor</i> Р-3116 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 0,280 | выявлена продукция холерного токсина |
| 8. | <i>V. cholerae eltor</i> М-1326 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 1,785 | выявлена продукция холерного токсина |
| 9. | <i>V. cholerae eltor</i> М-311 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 0,597 | выявлена продукция холерного токсина |
| 10. | <i>V. cholerae eltor</i> М-738 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 0,548 | выявлена продукция холерного токсина |
| 11. | <i>V. cholerae eltor</i> М-1328 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 1,655 | выявлена продукция холерного токсина |
| 12. | <i>V. cholerae eltor</i> М-1344 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 1,224 | выявлена продукция холерного токсина |

Продолжение таблицы 23

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----|--------------------------------------|--|-------|---|
| 13. | <i>V. cholerae</i> eltor M-1349 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 1,600 | выявлена продукция холерного токсина |
| 14. | <i>V. cholerae</i> O139 MO-45 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 0,737 | выявлена продукция холерного токсина |
| 15. | <i>V. cholerae</i> O139 P-16064 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 0,927 | выявлена продукция холерного токсина |
| 16. | <i>V. cholerae</i> O139 P-16131 | <i>ctxAB</i> ⁺ , <i>tcpA</i> ⁺ | 0,570 | выявлена продукция холерного токсина |
| 17. | <i>V. cholerae</i> eltor M-1280 | <i>ctxAB</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻ | 0,075 | продукция холерного токсина не обнаружена |
| 18. | <i>V. cholerae</i> eltor KM-26 | <i>ctxAB</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻ | 0,071 | продукция холерного токсина не обнаружена |
| 19. | <i>V. cholerae</i> eltor M-1242 | <i>ctxAB</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻ | 0,075 | продукция холерного токсина не обнаружена |
| 20. | <i>V. cholerae</i> eltor M-1257 | <i>ctxAB</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻ | 0,074 | продукция холерного токсина не обнаружена |
| 21. | <i>V. cholerae</i> eltor M-1445 | <i>ctxAB</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻ | 0,069 | продукция холерного токсина не обнаружена |
| 22. | <i>V. cholerae</i> non O1/O139 M-519 | <i>ctxAB</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻ | 0,064 | продукция холерного токсина не обнаружена |
| 23. | <i>V. cholerae</i> non O1/O139 M-521 | <i>ctxAB</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻ | 0,081 | продукция холерного токсина не обнаружена |
| 24. | <i>V. cholerae</i> non O1/O139 M-522 | <i>ctxAB</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻ | 0,080 | продукция холерного токсина не обнаружена |
| 25. | <i>V. cholerae</i> O139 M-375 | <i>ctxAB</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻ | 0,073 | продукция холерного токсина не обнаружена |
| 26. | <i>Escherichia coli</i> O111-BH-3133 | - | 0,050 | - |
| 27. | <i>Escherichia coli</i> 18 | - | 0,052 | - |
| 28. | <i>Escherichia coli</i> 1180 | - | 0,059 | - |
| 29. | Положительный контроль | - | 2,001 | - |
| 30. | Отрицательный контроль | - | 0,041 | - |

5.3 Результаты клинических испытаний

В соответствии с порядком внедрения в практику медицинского изделия диагностического назначения были подготовлены 2 серии тест-системы в соответствии с разработанными нами ТУ 9388-052-01898109-2015 и проведены клинические испытания.

Испытания тест-системы для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* проводили на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. На основании МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры»

[41] и Инструкции по применению препарата в качестве образцов для оценки диагностической эффективности выбрано 20 штаммов холерных вибрионов с различным набором маркеров эпидемической значимости и 6 штаммов гетерологичных микроорганизмов, характеристика которых представлена в таблице 24.

Таблица 24 Характеристика штаммов *V.cholerae* и гетерологичных микроорганизмов, использованных при проведении клинических испытаний

| № | Наименование штаммов | Место и год выделения | Наличие гена <i>ctxAB</i> по данным ПЦР |
|-----|----------------------------|------------------------|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1. | <i>V.cholerae</i> 569 В О1 | Индия, 1950 | + |
| 2. | <i>V. cholerae</i> М-311 | Каракалпакия, 1965 | + |
| 3. | <i>V. cholerae</i> Р-3122 | Украина, 1970 | + |
| 4. | <i>V. cholerae</i> М-818 | г. Балаково, 1970 | + |
| 5. | <i>V. cholerae</i> М-879 | г. Саратов, 1971 | + |
| 6. | <i>V. cholerae</i> КМ-26 | н/д, 1982 | - |
| 7. | <i>V. cholerae</i> М-1298 | г. Краснодар, 1993 | + |
| 8. | <i>V. cholerae</i> М-1326 | Дагестан, 1998 | + |
| 9. | <i>V. cholerae</i> М-1344 | г. Казань, 2001 | + |
| 10. | <i>V. cholerae</i> М-1349 | г. Казань, 2001 | + |
| 11. | <i>V. cholerae</i> М-1379 | г. Казань, 2001 | - |
| 12. | <i>V. cholerae</i> М-1436 | Калмыкия, 2006 | - |
| 13. | <i>V. cholerae</i> М-1463 | г. Москва, 2010 | + |
| 14. | <i>V. cholerae</i> М-1504 | Калмыкия, 2011 | - |
| 15. | <i>V. cholerae</i> М-1511 | Челябинская обл., 2012 | - |
| 16. | <i>V. cholerae</i> М-1509 | г. Химки, 2012 | + |

Продолжение таблицы 24

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|--|---|-----|
| 17. | <i>V.cholerae</i> O139 AP-1 | Индия, н/д | + |
| 18. | <i>V.cholerae</i> O139 P-16131 | Ростовская обл., 1993 | + |
| 19. | <i>V. cholerae</i> O139 M-375 | г. Жуковский, 1999 | - |
| 20. | <i>V. cholerae</i> не O1 не O139 M-522 | Якутия, 2007 | - |
| 21. | <i>Escherichia coli</i> O111-ВН-3133 | получен из института Пастера г. Ленинград | н/о |
| 22. | <i>Salmonella typhimurium</i> 20 | г. Чита, 1947 | н/о |
| 23. | <i>Salmonella typhi</i> 503 | получен из ГИСК им. Л.А. Тарасевича в 1956 г. | н/о |
| 24. | <i>Shigella dysenteriae sonnei</i> 59097 | г. Саратов, 1976 г. | н/о |
| 25. | <i>Shigella dysenteriae flexneri</i> 58848 | г. Саратов, 1976 г. | н/о |
| 26. | <i>Yersinia enterocolitica</i> 96 | г. Алма-Ата, 1979 г. | н/о |
| Примечание: н/д – нет данных, н/о - не определяют | | | |

Поскольку данная тест-система предназначена не только для исследования штаммов возбудителя холеры, но и проб биологического материала была очевидна необходимость включения в испытания искусственно контаминированных проб биологического материала штаммами *V.cholerae*. В качестве биологического материала использовали испражнения, поскольку в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры»[41] в пробах фекалий наиболее вероятно наличие холерного токсина, продуцируемого штаммами холерного вибриона в условиях *in vivo*. Биологические пробы искусственно контаминировали эпидемически опасными и безопасными штаммами *V.cholerae* O1 и O139 серогрупп до конечной концентрации 1×10^2 и 1×10^9 м.к./мл (по 64 пробы каждой), а также штаммами гетерологичных микроорганизмов - до 1×10^4 м.к./мл (24 пробы). Выбор вышеуказанных концентраций холерного вибриона обусловлен тем, что в фекалиях больных алгидной формой холеры концентрация возбудителя достигает 1×10^6 и 1×10^9 м.к./мл. В испражнениях же пациентов легкой формой и леченых антибиотиками, а также реконвалесцентов и

вибрионосителей количество холерных вибрионов обычно не превышает 1×10^2 и 1×10^4 м.к./мл [41].

Культивирование штаммов микроорганизмов и приготовление бактериальных суспензий проводили в соответствии с п.п. 2.2.1 и 2.2.3.2, постановку ИФА согласно п. 5.1. Пробы биологического материала могут быть исследованы нативными, поскольку содержат ХТ, продуцируемый холерными вибрионами в условиях *in vivo*, либо после предварительного подращивания в бульоне АКІ, способствующего увеличению количества ХТ в образце, что играет особо важную с эпидемиологической точки зрения роль при анализе материала от вибрионосителей, у которых концентрация возбудителя, как указывалось ранее, может быть не выше $1,0 \times 10^2$ м.к./мл.

Поскольку в инструкции предусмотрено подращивание штаммов *V.cholerae* в среде АКІ с использованием трех разных типов пробирок, анализ каждого штамма осуществляли трижды с помощью двух серий препарата.

Результаты исследования проб чистых культур микроорганизмов и проб биологического материала нашли отражение в таблицах 25 и 26.

Таблица 25 Сводные данные клинических испытаний эффективности «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» по ТУ 9388-052-01898109-2015

| Наименование проб | Число проб | Количество положительных ответов | | |
|---|------------|----------------------------------|----------|-----------|
| | | ИФАХолХТ-М | | ELISA-GM1 |
| | | Серия 06 | Серия 07 | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Пробы чистых культур штаммов <i>V. cholerae</i> (ctxAB ⁺) после подращивания | 39 | 39 | 39 | 39 |
| Пробы клинического материала, контаминированные бульонными культурами <i>V. cholerae</i> (ctxAB ⁺), содержащими ХТ и клетки патогена в концентрации 1×10^9 м.к./мл, нативные | 12 | 12 | 12 | 12 |

Продолжение таблицы 25

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|-----|-----|-----|-----|
| Пробы клинического материала, контаминированные бульонными культурами <i>V. cholerae</i> (<i>ctxAB</i> ⁺), содержащими ХТ и клетки патогена в концентрации 1×10^2 м.к./мл, нативные | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Пробы клинического материала, контаминированные бульонными культурами <i>V. cholerae</i> (<i>ctxAB</i> ⁺), содержащими ХТ и клетки патогена в концентрации 1×10^9 м.к./мл, после подращивания | 36 | 36 | 36 | 36 |
| Пробы клинического материала, контаминированные бульонными культурами <i>V. cholerae</i> (<i>ctxAB</i> ⁺), содержащими ХТ и клетки патогена в концентрации 1×10^2 м.к./мл, после подращивания | 36 | 36 | 36 | 36 |
| Итого положительных проб, содержащих холерный токсин | 135 | 135 | 135 | 135 |

В 39 пробах бульонных культур токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* (*ctxAB*⁺), содержащих ХТ, был получен положительный результат в 100% случаев.

В 24 пробах клинического материала, контаминированных бульонными культурами токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* (*ctxAB*⁺) в концентрациях 1×10^9 м.к./мл и 1×10^2 м.к./мл, без подращивания, содержащих ХТ, был получен положительный результат в 100% случаев.

В 72 пробах клинического материала, контаминированных бульонными культурами токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* (*ctxAB*⁺) в концентрациях 1×10^9 м.к./мл и 1×10^2 м.к./мл, после подращивания, содержащих ХТ, был получен положительный результат в 100% случаев.

Таким образом, при анализе 39 проб чистых бульонных культур токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* (*ctxAB*⁺), содержащих ХТ, и 96 пробах клинического материала, контаминированных бульонными культурами токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* (*ctxAB*⁺) в концентрациях 1×10^9 м.к./мл и 1×10^2 м.к./мл, без и после подращивания, содержащих ХТ, положительный результат получен в 135 случаях.

Таблица 26 Сводные данные клинических испытаний специфичности «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» по ТУ 9388-052-01898109-2015

| Наименование проб | Число проб | Количество отрицательных ответов | | |
|---|------------|----------------------------------|----------|-----------|
| | | ИФАХолХТ-М | | ELISA-GM1 |
| | | Серия 06 | Серия 07 | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Пробы чистых культур штаммов <i>V.cholerae</i> (ctxAB ⁻) после подращивания | 21 | 21 | 21 | 21 |
| Пробы клинического материала, контаминированные бульонными культурами <i>V.cholerae</i> (ctxAB ⁻), содержащими клетки патогена в концентрации 1×10^9 м.к./мл, нативные | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Пробы клинического материала, контаминированные бульонными культурами <i>V.cholerae</i> (ctxAB ⁻), содержащими клетки патогена в концентрации 1×10^2 м.к./мл, нативные | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Пробы клинического материала, контаминированные бульонными культурами <i>V.cholerae</i> (ctxAB ⁻), содержащими клетки патогена в концентрации 1×10^9 м.к./мл, после подращивания | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Пробы клинического материала, контаминированные бульонными культурами <i>V.cholerae</i> (ctxAB ⁻), содержащими клетки патогена в концентрации 1×10^2 м.к./мл, после подращивания | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Пробы чистых культур штаммов гетерологичных микроорганизмов после подращивания | 18 | 18 | 18 | 18 |

Продолжение таблицы 26

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|----|----|----|----|
| Пробы клинического материала, контаминированные бульонными культурами гетерологичных микроорганизмов, содержащими клетки патогена в концентрации 1×10^9 м.к./мл, нативные | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Пробы клинического материала, контаминированные бульонными культурами гетерологичных микроорганизмов, содержащими клетки патогена в концентрации 1×10^2 м.к./мл, нативные | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Пробы клинического материала, контаминированные бульонными культурами гетерологичных микроорганизмов, содержащими клетки патогена в концентрации 1×10^9 м.к./мл, после подращивания | 9 | 9 | 9 | 9 |
| Пробы клинического материала, контаминированные бульонными культурами гетерологичных микроорганизмов, содержащими клетки патогена в концентрации 1×10^2 м.к./мл, после подращивания | 9 | 9 | 9 | 9 |
| Итого отрицательных проб, не содержащих холерный токсин | 79 | 79 | 79 | 79 |

При исследовании 21 пробы чистых бульонных культур нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* (ctxAB⁻), не содержащих ХТ, был получен отрицательный результат в 100% случаев.

В 4 пробах клинического материала, контаминированных бульонными культурами нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* (ctxAB⁻) в концентрациях 1×10^2 м.к./мл и 1×10^9 м.к./мл, без подращивания, был получен отрицательный результат в 100% случаев.

В 12 пробах клинического материала, контаминированных бульонными культурами нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* (ctxAB⁻) в концентрациях 1×10^2 м.к./мл и 1×10^9 м.к./мл, после подращивания, был получен отрицательный результат в 100% случаев.

В 36 пробах бульонных культур гетерологичных микроорганизмов, не содержащих ХТ, был получен отрицательный результат в 100% случаев.

В 6 пробах клинического материала, контаминированных бульонными культурами нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* (ctxAB⁻) в концентрациях 1×10^2 м.к./мл и 1×10^9 м.к./мл, без подращивания, был получен отрицательный результат в 100% случаев.

В 18 пробах клинического материала, контаминированных бульонными культурами нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* (ctxAB⁻) в концентрациях 1×10^2 м.к./мл и 1×10^9 м.к./мл, после подращивания, был получен отрицательный результат в 100% случаев.

При проведении испытаний тест-системы «ИФАХолХТ-М» на 39 пробах, контаминированных бульонными культурами нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* и гетерологичными микроорганизмами (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae sonnei*, *Shigella dysenteriae flexneri*, *Yersinia enterocolitica*), а также на 40 пробах клинического материала, контаминированных бульонными культурами нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* (ctxAB⁻) и гетерологичными микроорганизмами в концентрациях 1×10^9 м.к./мл и 1×10^2 м.к./мл, без и после подращивания, не содержащих ХТ, отрицательный результат получен в 79 случаях.

Использование референтного метода ELISA-GM1 подтвердило наличие ХТ в положительных пробах, содержащих ХТ, продуцируемый токсигенными штаммами *V.cholerae* (ctxAB⁺), и отсутствие ХТ в отрицательных пробах, не содержащих ХТ.

Таким образом, в результате проведенных клинических испытаний доказана диагностическая эффективность медицинского изделия «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae*» по ТУ 9398-052-01898109-2015: диагностическая чувствительность – не менее 99,1% с доверительной вероятностью 90%; диагностическая специфичность – не менее 99,5% с доверительной вероятностью 90%.

Заключение

В последнее десятилетие в мире отмечен рост заболеваемости холерой, а также прогнозируется сохранение этой тенденции на основании сложной эпидемиологической обстановки в ряде стран. Постоянная угроза возникновения заболеваний людей в связи с миграцией населения из неблагополучных по холере регионов, низкий социально-экономический уровень населения в местах военных конфликтов и скопления беженцев придают актуальность проблеме совершенствования противоэпидемических мероприятий, в том числе лабораторной диагностики холеры. В Российской Федерации в результате завоза холеры и ежегодного выделения холерных вибрионов из объектов окружающей среды прогноз по данному заболеванию остается неблагоприятным, поэтому очевидна необходимость своевременного выявления возбудителя холеры специфичными, высокочувствительными и по возможности простыми по технике исполнения методами [47, 202].

Холерный токсин занимает ведущее место в патогенезе холеры [35, 100, 116, 139]. Наиболее перспективными иммунореагентами для определения холерного энтеротоксина, на наш взгляд, являются моноклональные антитела, позволяющие в относительно небольшой срок с минимальными затратами, без использования специального оборудования, безопасно определить продукцию холерного токсина культурами холерных вибрионов, выделенных из клинического материала, и дифференцировать токсигенные штаммы *V. cholerae* от нетоксигенных.

В связи с этим первоначальным этапом исследований явилось получение панели гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к холерному токсину. Согласно принципам классической иммунологии, заключающихся в варьировании дозы антигена, кратности иммунизации и интервала между ними для достижения максимальной стимуляции антителопродуцирующих клонов В-клеток требуемой специфичности, проведена работа по отработке схемы иммунизации биопродуцентов препаратом ХТ, обеспечивающая индукцию у животных достаточно высоких титров специфических антител для дальнейшей процедуры гибридизации.

Гибридомы, синтезирующие иммуноглобулины к видоспецифическим эпитопам ХТ, получали путем слияния иммунных спленоцитов мышей инбредной линии BALB/c, сингенных по отношению к плазмацитоме *Sp.2/0- Ag.8* и клеток миеломы в состоянии

логарифмической фазы. В качестве сливающего агента использовался полиэтиленгликоль с м.м. 4000 Да (Merck, Германия).

В результате исследования показано, что эффективность гибридизации составила $84 \pm 0,5\%$. В ходе первичного скрининга гибридом было отобрано 30 % лунок, положительно реагирующие в ИФА с препаратом ХТ. Гибридомы с максимальными и стабильно регистрируемыми значениями ОП были отобраны для проведения клонирования методом лимитирующих разведений. После нескольких реклонирований в качестве перспективных отобрано 5 клонов: 1D5, 2E5, 3E5, 3D3, 3C4. Гибридомы обеспечивали образование иммуноасцитической жидкости у мышей BALB/c в количестве от $6,5 \pm 0,7$ мл до $7,5 \pm 0,5$ мл на 9 – 10 день.

При взаимодействии с препаратом термолабильного токсина *E. coli* наблюдался положительный ответ с МКА, продуцируемыми гибридомами 1D5, 3D3, 3C4, что указывает на перекрестную реактивность данных антител в отношении ХТ и LT.

Для последующих исследований были отобраны гибридомы 2E5 и 3E5, которые продуцируют *in vitro* до 40 мкг/мл МКА, обладают высокой аффинностью в отношении ХТ и ориентированы к различным его эпитопам.

Полученные нами моноклональных антител различной эпитопной направленности предопределили попытку их использования в качестве основы при конструировании диагностической иммуноферментной тест-системы.

Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления и идентификации токсигенных штаммов холерного вибриона включала определение сорбционной активности специфических антитоксических МКА, их дифференциацию на связывающие и детектирующие антитела. По результатам исследований установлено, что наилучшим показателем обладали МКА 3E5. При сорбировании лунок планшетов 10 мкг/мл данных антител удалось детектировать наименьшие концентрации ХТ. Наиболее подходящими для проявления комплекса АГ-АТ оказались МКА 2E5* в разведении 1:800 (0,28 мкг/мл иммуноглобулинов).

Для конструирования сэндвич-варианта иммуноферментной тест-системы, предназначенной для определения продукции холерного токсина, были использованы разноэпитопные МКА гибридом 2E5 и 3E5, которые, как отмечалось выше, стабильно продуцируют *in vitro* достаточно большое количество МКА (до 40 мкг/мл) с высокой аффинностью в отношении ХТ.

Поскольку сорбционная емкость полистироловых планшетов может существенно влиять на эффективность иммуноферментного анализа была оценена чувствительность созданной нами диагностической тест-системы с применением планшетов и стрипов Costar (США) и Greiner bio-one (Германия) с повышенной сорбционной емкостью в сравнении с планшетами Медполимер (Россия), в тестируемых разведениях ХТ от 1 мкг/мл до 0,01 нг/мл.

При использовании планшетов Costar (США) аналитическая чувствительность ИФА составила 0,1 нг/мл, что в 2 раза выше по сравнению с планшетами Greiner bio-one (Германия) и более чем в 10 раз выше планшетов Медполимер (Россия). Поэтому для проведения последующих исследований были выбраны планшеты фирмы Costar (США).

Определение холерного токсина включает не только проведение ИФА для обнаружения токсина, но и предварительный этап его индукции у штаммов *V. cholerae* в условиях *in vitro*, который предусматривает культивирование вибрионов во флаконах, содержащих 200 мл среды АКІ, при постоянном покачивании. Выполнение такой процедуры трудоемко и продолжительно, а также связано с высоким риском биологической опасности.

В связи с этим нами была разработана более безопасная, экономичная и занимающая меньше времени схема индукции ХТ вибрионами *in vitro*: посев агаровой культуры в стеклянную пробирку с 10 мл АКІ на 2,5 часа при температуре 37 °С (первичное подращивание), далее пересев 1 или 2 мл подращенной культуры в центрифужную пробирку с 5 или 10 мл АКІ, соответственно, расположив её в практически горизонтальном положении под углом 5-10° (без касания жидкости крышки пробирки) и инкубации в термостате при температуре 37 °С в течение 16 часов (вторичное подращивание).

В качестве тест-штаммов вибрионов были выбраны: токсигенные *V.cholerae* классического биовара 569В, М-41, токсигенные *V.cholerae* биовара эльтор Р-3122, М-879, М-1509, нетоксигенные *V.cholerae* биовара эльтор КМ-26 и *E.coli* O157. При этом штаммы холерных вибрионов биовара эльтор Р-3122 и М-879 относились к типичным представителям данного биовара и содержали *ctxB3* аллель, а штамм М-1509 – к генетически измененному варианту, несущему *ctxB1* аллель.

Индукцию ХТ при культивировании указанных штаммов *V.cholerae* и постановку ИФА с GM1-ганглиозидом осуществляли в соответствии с рекомендациями ВОЗ [1994]

в сравнении с усовершенствованной нами пробоподготовкой и постановкой ИФА с использованием холерных антитоксических моноклональных антител.

При исследовании бактериальных суспензий токсигенных штаммов *V.cholerae* 569В, М-41, Р-3122, М-879, М-1509 во всех случаях получен положительный ответ, что указывает на наличие у данных штаммов холерного токсина.

Разработанный «сэндвич»-вариант ИФА для определения ХТ с применением МКА 2Е5 и 3Е5 обеспечивает высокую аналитическую чувствительность анализа – до 0,1 нг/мл при исследовании препарата чистого токсина и бульонных культур токсигенных штаммов *V.cholerae*. Он позволяет с одинаковой эффективностью детектировать ХТ у штаммов *V.cholerae* классического биовара и генетически измененных вариантов эльтор, продуцирующих в условиях *in vitro* высокое количество токсина I типа, и типичных штаммов *V.cholerae eltor*, индукция токсина II типа у которых незначительна.

В соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры»[41] в пробах фекалий наиболее вероятно наличие холерного токсина, продуцируемого штаммами холерного вибриона в условиях *in vivo*. В материале от больных алгидной формой холеры концентрация возбудителя достигает 1×10^6 - 1×10^9 м.к./мл. В испражнениях же пациентов легкой формой и леченных антибиотиками, а также реконвалесцентов и вибрионосителей количество холерных вибрионов обычно не превышает 1×10^2 - 1×10^4 м.к./мл [41].

Исследование стабильности специфической активности тест-системы при хранении позволило установить срок годности – 6 месяцев (срок наблюдения), а изучение стабильности показателей вскрытых реагентов (компоненты № 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) тест-системы «ИФАХолХТ-М» дало возможность установить, что они сохраняют свою специфическую активность в течение 3 суток при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$. Проведенные в 2015 г. технические испытания подтвердили соответствие основным характеристикам нормативно-технической документации. позволило установить, что приготовленные серии препаратов после растворения

Для оценки диагностической чувствительности и специфичности холерной моноклональной ИФА тест-системы были проведены клинические испытания на 20 токсигенных и нетоксигенных штаммах холерного вибриона и 6 штаммах гетерологичных микроорганизмов кишечной группы. Были сформированы 4 группы

проб, в первую из которых вошли бульонные культуры токсигенных штаммов холерных вибрионов (*ctx AB⁺*), выращенные в среде АКІ по предложенному нами более безопасному, экономичному, с меньшими временными затратами способу, в отличие от рекомендованного ВОЗ [1994], а во-вторую – выращенные тем же, рекомендованным нами способом бульонные культуры нетоксигенных штаммов *V.cholerae*. Третью и четвертую группы представляли пробы клинического материала (испражнения), контаминированного в одном случае токсигенными культурами холерного вибриона в концентрации 1×10^2 м.к./мл и 1×10^9 м.к./мл и во-втором случае культурами в той же концентрации нетоксигенных штаммов *V.cholerae* и гетерогенных микроорганизмов, исследованные с подращиванием и без него.

В результате проведенных клинических испытаний в пробах бульонных культур и контаминированного биологического материала, содержащих токсигенные штаммы *V. cholerae*, продукция холерного токсина определена в 100% случаев. С аналогичными образцами бульонных культур и биологического материала, контаминированного нетоксигенными штаммами *V.cholerae* и гетерогенными микроорганизмами кишечной группы, получен 100% отрицательный результат.

Доказана диагностическая эффективность медицинского изделия «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae*» по ТУ 9398-052-01898109-2015: диагностическая чувствительность – не менее 99,1% с доверительной вероятностью 90%; диагностическая специфичность – не менее 99,5% с доверительной вероятностью 90%.

Таким образом, разработана диагностическая холерная антитоксическая моноклональная иммуноферментная тест-система, в комплектацию которой вошли планшет или стрип с активированной МКА поверхностью дна лунок и конъюгат, представляющий собой моноклональные антитоксические холерные иммуноглобулины, меченные пероксидазой хрена, а также реагенты для буферных растворов и субстратной смеси, с целью проявления комплекса антиген-антитело. Кроме того, исходя из оптимальных условий подращивания вибрионов в бульоне АКІ, в комплект тест-системы включена сухая навеска указанной питательной среды.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения тест-системы «ИФАХолХТ-М» для лабораторной диагностики холеры, а также мониторинга эпидемически значимых штаммов *V.cholerae* в пробах клинического материала и

объектах окружающей среды, и дифференциации токсигенных штаммов *V.cholerae* от нетоксигенных.

Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения выдано Регистрационное удостоверение № РЗН 2016/5013 от 15.11.2016 г., на медицинское изделие «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)», которое приказом Росздравнадзора от 15.11.2016 г. № 12672 допущено к обращению на территории Российской Федерации.

ВЫВОДЫ

1. Получена панель из пяти гибридов, две из которых (2Е5 и 3Е5) стабильно продуцируют МКА специфичные к ХТ, а три (1D5, 3D3, 3C4) – МКА, специфичные к ХТ и LT *E.coli*, характеризующиеся высокой стабильностью с сохранением исходной активности в течение IX пассажей *in vivo*.

2. Подобрана пара разноэпитопных связывающих и детектирующих МКА и определены их оптимальные (10 мкг/мл и 0,28 мкг/мл соответственно) концентрации для антигенспецифического взаимодействия, позволяющие выявлять холерный токсин штаммов *V. cholerae* классического и эльтор биоваров, в том числе генетически измененных по *ctxB1* аллели, с пороговой чувствительностью – 0,1 нг/мл в «сэндвич»-варианте иммуноферментного анализа.

4. Разработана схема индукции ХТ *V.cholerae* в среде АКІ в пластиковых центрифужных пробирках в небольшом объеме (5-10 мл) питательной среды без термошейкера, что снижает биологическую опасность процесса, связанного с риском образования аэрозоля в случае аварийной ситуации, а также сокращает сроки исследования в сравнении с предложенным за рубежом методом определения холерного токсина *in vitro* с использованием GM1-ганглиозидов.

5. Диагностическая ценность разработанной «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» подтверждена результатами лабораторных, технических и клинических испытаний, в ходе которых установлена высокая специфичность (99,5%) и чувствительность (99,1%) разных серий препарата и отмечено полное соответствие его свойств критериям качества, заявленным в ТУ 9388-052-01898109-2015.

6. Применение разработанной «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» позволяет выявлять холерный токсин I и II типов в пробах клинического материала и в чистых культурах холерных вибрионов, выделенных из клинического материала, а также дифференцировать токсигенные штаммы *V.cholerae* от нетоксигенных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абгарян, А.Г. Совершенствование метода индикации возбудителя сибирской язвы. / А.Г. Абгарян, Е.И. Еременко, В.И. Ефременко, Е.Н. Афанасьев, И.В. Жарникова // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2003. – № 6. – С. 47-51.
2. Алексеева, Л.П. Моноклональные антитела к липополисахариду в иммунологии и диагностике холеры: Автореф... дис. д-ра. биол. наук. – Саратов, 1993.
3. Аленкина, Т.В. Обнаружение холерного энтеротоксина на поверхности клеток холерного вибриона методом непрямой иммунофлуоресценции. / Т.В. Аленкина, И.В. Грачева, З.Л. Девдариани // Акт. вопр. профил. чумы и др. инфекц. забол. Ставрополь – 1994. – С. 117.
4. Аленкина, Т.В. Усовершенствование лабораторной диагностики с помощью антиэнтеротоксических моноклональных антител [Текст]: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.36 / Аленкина Татьяна Владимировна. – Саратов, 1996. – 229 с.
5. Антитела. Методы. / Под ред. Д.Кэтти. – Т. 1. – М.: Мир, 1991. – 384 с.
6. Ашмарин, И.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. / И.А. Ашмарин, А.А. Воробьев – Л.: Медгиз. 1962. – 180 с.
7. Балахонов, С.В. Определение генных детерминант холерного энтеротоксина методом полимеразной цепной реакции. / С.В. Балахонов, В.С. Ганин, Л.Я. Урбанович // Журнал инфекционной патологии. – 1998. – N 4. – С. 52-54.
8. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118 – 13. Бюлл. нормат. и метод. документов Госсанэпиднадзора. – 2013. – Вып. 64. – 156 с.
9. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней: Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322 – 08 – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.
10. Белая, Ю.А. Определение холерного энтеротоксина с помощью реакции коаггутинации. / Ю.А. Белая, И.Н. Гайлонская, С.М. Быстрова, Г.К. Ферапонтов // Вестн. Акад. мед. наук СССР. – 1984. – № 10. – С. 69-73.

11. Блему, Ж. Реакция коаггутинации для серологической типизации культур *Haemophilus pleuropneumoniae* и индикации возбудителя в патологическом материале [Текст]: автореф. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Блему Жорж. – Москва, 1993. – 18 с.
12. Бочарова, Н. Г. Новая тест система обнаружения специфических антител / Н.Г. Бочарова // Сб. науч. трудов ВИЭВ. – 1979. – Вып. 4. – С. 157-161.
13. Буркин, М.А. Иммуноферментное определение столбнячного токсина и анатоксина с использованием моноклональных антител. / М.А. Буркин, В.В. Свиридов, О.В. Перелыгина // Прикл. биох. и микроб. – 2004. – Т. 40. – № 4. – С. 478-484.
14. Владимцева, И.В. Иммунофлюоресцентный метод обнаружения холерного энтеротоксина. / И.В. Владимцева, В.И. Ефременко, В.Г. Пушкарь, Ю.А. Голосеев, Е.Н. Трофимов // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1986. – № 12. – С. 62-65.
15. Гибридные клетки. / Рингерц Н., Сэвидж Р. – М.: Мир, 1979. – 415 с.
16. ГОСТ Р ЕН 13640-2010 Исследование стабильности реагентов для диагностики *in vitro*. – М.: Стандартиформ, 2011. – 11с.
17. Гришин, Е.В. Получение моноклональных антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli* для разработки биплексного анализа токсинов в объектах окружающей среды. / Е.В. Гришин, Т.И. Валякина. // Биотехнология. – 2013. – Т. 6. - № 4. – С. 19-32.
18. Давыдова, Н. А. Конструирование тест-системы для выявления возбудителя холеры методом полимеразной цепной реакции: [Текст]: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Давыдова Наталия Александровна. – Саратов, 2001. – 159 с.
19. Девдариани, З.Л. Экспресс-идентификация токсигенных штаммов возбудителя холеры. / З.Л. Девдариани, Т.В. Аленкина, В.А. Федорова // Матер. научн.-практ. конф., посвящ. 100-летию образ. противочумной службы России. – 1997. – Т. 2. – С. 171-172.
20. Девдариани, З.Л. Экспресс-диагностика токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* в дот-иммунологическом анализе с помощью моноклональных антител. / З.Л. Девдариани, Т.А. Аленкина, В.А. Федорова // Клин. лаб. диагн. – 1999. – № 8. – С. 24-33.
21. Девдариани, З.Л. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*). / З.Л. Девдариани, Н.Е. Терешкина, Т.М. Тараненко, М.Н. Киреев,

- И.В. Терехова, Г.В. Григорьева, М.Н. Исляева, Н.М. Ермаков, Н.А. Виноградова, А.Н. Малахаева // Пробл. особо опасных инф. – 2013. – Вып. 1. – С. 74-78.
22. Девдариани, З.Л. Конструирование и медицинские испытания моноклональной иммуноферментной тест-системы для выявления капсулосодержащих штаммов чумного микроба «ИФАПестФ1-М». / З.Л. Девдариани, Н.А. Сырова, Е.А. Михеева, И.В. Терехова, Н.М. Ермаков, Г.В. Григорьева, О.А. Лобовикова, И.В. Шульгина // Пробл. особо опасных инф. – 2016. – Вып. 3. – С. 85-89.
23. Дифтерия у детей / В.В. Иванова, О.В. Родионова, А.А. Аксенов – Спб., 2000. – 255 с.
24. Дурихин, К.В. Сравнительная характеристика некоторых количественных методов оценки биологической активности холерогена. / К.В. Дурихин, А.Е. Попова–1974. – Вып. 4 – С. 88-89.
25. Дурихин, К.В. Продукция холерогена и нейроминидазы холерными вибрионами *in vitro*. / К.В. Дурихин, А.Е. Попова, Г.Д. Кобринский // Бюл. Экспер. биол. и мед. – 1976. – № 81. – № 5 – С. 566-567.
26. Заднова, С.П. Штаммы *Vibrio cholera* с измененной экспрессией генов вирулентности [Текст]: дисс. ... докт. биол. наук: 03.00.07, 03.00.04 / Заднова Светлана Петровна. – Саратов, 2009. – 238 с.
27. Зайденов, В.А. Эпитопный анализ капсульного антигена чумного микроба с помощью панели моноклональных антител. / В.А. Зайденов, Г.А. Игнатьева, В.И. Новиков // Ген., микробиол. и совершенствование методов лаб. диагностики ООИ. – 1991. – С. 69-71.
28. Зими́на, Л.Г. Методы выделения и идентификации коринебактерий дифтерии в бактериологических лабораториях г. Москвы / Л.Г. Зими́на, О.Н. Зайцева // Состояние и перспективы разработки препаратов для диагностики вирусных гепатитов и инфекций, управляемых специфическими средствами профилактики: Мат. докл. Всерос. научн-практич. конф. — Пермь, 1993. — С. 43-44.
29. Иммунологические методы исследований. / Под ред. И. Лефковитс, Б. Пернуса – М: Мир. – 1988. – 350 с.
30. Иммунологические методы. / Под ред. Г. Фримеля, Пер. с нем. А. П. Тарасова. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
31. Иммунология/ Под ред. У. Пол: В 3-х т. – Т. 1-3.-М.: Мир, 1987-1989.

32. Иммунология. / Под ред. А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл – М.: Мир, 2000. – 582 с.
33. Комплексная гено-и иммунодиагностическая тест-система для идентификации холерных вибрионов O1 и O139 серогруппы и оценки их вирулентности: пат. 2404257 Рос. Федерация: МПК C12Q1/68 / Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Крепостнова И.М., Захарова Т.Л., Осин А.В., Смирнова Н.И.; заявитель и патентообладатель ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU). – опубл. 20.11.2010, Бюл. № 32.
34. Лабинская, А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. – М.: Медицина. – 1978. – С. 391.
35. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев. – М: Медицина, Шико. – 2009. – 472 с.
36. Любавина, И.А. Методы экспресс-анализа стафилококкового энтеротоксина А в продуктах питания. / И.А. Любавина, Ф.А. Бровко, Т.И. Валякина, Ю.В. Вертиев, Е.В. Гришин // Биоорганическая химия. – 2014. – Т. 40. – № 2. – С. 186-195.
37. Малов, В.А. Острые инфекционные диарейные заболевания /В. А. Малов, А. Н. Горобченко // Лечащий врач. – 2005. – №2. – С. 6-8.
38. Матвеев, К. И. Ботулизм / К. И. Матвеев. – М. – 1959.-408 с.
39. Маянский, Н.А. MALDI-TOF масс-спектрометрия в рутинной работе микробиологической лаборатории. / Н.А. Маянский, А.Н. Калакуцкая, О.В. Мотузова, Г.Г. Ломинадзе, О.А. Крыжановская, Л.К. Катосова // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2011. – Т. 3 № 5. – С. 20-25.
40. Методические указания «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». – МУК 4.2.3065-13. – М., 2013.
41. Методические указания «Лабораторная диагностика холеры». – МУК 4.2.2218-07. – М., 2007.
42. Методические указания «Метод определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах». – МУК 4.2.2429-08. – М., 2008.
43. Методические указания «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям». – МУК 4.1/4.2.588-96. – М., 1996.

44. Моноклональные антитела / Кеннет Р.Г., Мак-Керн Т.Дж., Бехтол К.Б. – М.: Медицина, 1983. – 416 с.
45. Москвитина, Э.А. Характеристика эпидемиологической обстановки по холере в мире (2003-2012 гг.) и прогноз на 2013 г. [Текст] / Э.А. Москвитина, А.Б. Мазрухо, О.Л. Адаменко, О.А. Арешина, А.А. Назаретян, В.Д. Кругликов, С.М. Иванова, Д.А. Козина // Пробл. особо опасн. инфекций. – 2013. – Вып. 1. – С. 11-17.
46. Москвитина, Э.А. Холера в начале XXI века. Прогноз на глобальном уровне [Текст] / Э.А. Москвитина, А.Б. Мазрухо, О.Л. Адаменко, В.Д. Кругликов // Пробл. особо опасн. инфекций. – 2012. – Вып. 1 (111). – С. 11-16.
47. Москвитина, Э.А. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире в 2013 г., прогноз на 2014 г. [Текст] / Э.А. Москвитина, О.Л. Адаменко, И.В. Дворцова, В.Д. Кругликов, С.М. Иванова, Д.А. Козина // Пробл. особо опасн. инфекций. – 2014. – Вып. 2. – С. 19-26.
48. Микроорганизмы, токсины и эпидемии. / М.В. Супотницкий– М.: Вузовская книга, 2000. – 376 с.
49. Москвитина, Э.А. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005-2014 гг. Прогноз на 2015 г. [Текст] / Э.А. Москвитина, О.Л. Адаменко, В.Д. Кругликов, С.В. Титова, Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, С.М. Иванова, Г.Б. Анисимова // Пробл. особо опасн. инфекций. – 2015. – Вып. 1. – С. 18-25.
50. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. / В.В. Свиридов, Е.М. Зайцев, А.А. Дельвиг, И.К. Мазурова, Б.Ф. Семенов – 1986. – Т. 1. – С. 30–35.
51. Мустафин, Т.Р. Разработка полиспецифического эритроцитарного антительного ботулинического диагностикума для реакции непрямой гемагглютинации. / Т.Р. Мустафин, А.А. Иванов, Э.Н. Мустафина, Н.С. Садыков // Ученые записки Казанской Государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2014. – Т. 217. – С. 166-171.
52. Национальный стандарт Российской Федерации исследование стабильности реагентов для диагностики *in vitro*. – ГОСТ Р ЕН 13640-2010. – М.: Стандартиформ, 2012.
53. Никитин, В. М. Справочник серологических реакций / В. М. Никитин. // Кишинев. – 1977. – 205 с.

44. Никифоров, В. В. Ботулизм / Учебно - методическое пособие для врачей // В. В. Никифоров, Н. А. Малышев, Б. И. Санин. – М. – 2003. – 32 с.
45. Никифоров, В. Н. Ботулизм / В. Н. Никифоров, В. В. Никифоров. – М.: Медицина. – 1985. – 198 с.
46. Онищенко, Г. Г. Эпидемиологическое благополучие населения России [Текст] / Г.Г. Онищенко // ЖМЭИ. – 2013. – № 1. – С. 42-50.
47. Онищенко, Г.Г. Холера в начале XXI века. Прогноз / Г.Г.Онищенко, Ю.М. Ломов, Э.А. Москвитина, Ю.М. Федоров, Л.С. Подосинникова, А.В. Горобец // ЖМЭИ. – 2005. – № 3. – С. 44-48.
48. Остроумова, Н.М. Лизогенные системы и свойства умеренных фагов *Vibrio cholerae* 0139 серовара. / Н.М. Остроумова, В.П. Мороз, Н.А. Синичкина // Пробл. особо опасных инфекций. – 1998. – С. 141-147.
49. Папуниди, К. Х. Иммуноферментный метод для серологической диагностики ботулизма. / К. Х. Папуниди, Г. А. Адагамова // Материалы научной конференции ВНИВИВВиЛ. – 1992. – № 4.2. – С. 273 – 274.
50. Петрова, Е.Э. Получение и характеристика моноклональных антител к холерному токсину. / Е.Э. Петрова, Р. Л. Комалева, О.Е. Лахтина, Л.В. Самохвалова, Н.А. Калинина, Н.С. Сошина, А.Ю. Рубина, М.А. Филиппова, Ю.В. Вертиев, Т.И. Валякина, Е.В. Гришин // Биоорганическая химия. – 2009. – № 3 – С. 357 - 367.
51. Практикум по биохимии. / Под ред. Северина С.Е., Соловьева Г.А. – М.: МГУ, 1989. – 509 с.
52. Практическое руководство по лаб. диагн. опасных инф. болезней. / Под ред.акад. РАМН Г.Г. Онищенко, акад. РАМН В.В.Кутырева. – Изд. 2-е. – М.:ЗАО «Шико», 2013. – 560 с.
53. Пяткин, К. Д. Микробиология / К. Д. Пяткин, Ю. С. Кривошеин. – М.: Медицина. – 1981. – 511 с.
54. Свиридов, В.В. Иммунодиагностика дифтерии при помощи набора «Дифтерия-Монозим». / В.В. Свиридов, Е.М. Зайцев, А.Е. Луговая // Совр. напр. Создания мед. Диагностикумов: Тез. докл. Всесоюзн. конф. – 1993. – С. 43.
55. Свиридов, В.В. Использование моноклональных антител к дифтерийному токсину в клинической диагностике и эпидемиологической практике. / В.В. Свиридов,

- Н.Г.Титова, И.В. Яковлева // Мат. 7-го съезда Всерос. общества эпидемиол., микробиол., паразитол. – 1997. – С. 493-494.
56. Способ детекции ботулинических токсинов: пат. 2517120 РФ: МПК G01N33/53 / Т.Ю. Загоскина, С.В. Балахонов, О.А. Носкова, Е.Н. Субычева, Е.Ю. Марков, Л.Е.Токарев, Т.М. Долгова, Т.С. Тайкова; заявитель и патентообладатель ФКУЗ Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU). – опубл. 27.05.2014, Бюл. № 15.
57. Способ консервации иммунопероксидазного конъюгата: пат. 2549971 РФ: МПК 33/531 №2014126682/15 / А.А. Зайцев, О.А. Гнусарева, С.А. Курчева, Ю.Ю. Гаркуша, И.С. Тюменцева, Т.И. Рыбалко, А.Н. Куличенко; ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU) –, опубл. 10.05.2015, Бюл. №13.
58. Способ определения наличия протективного антигена сибирской язвы на основе иммунодетекции, сопряженной с полимеразной цепной реакцией: пат. 2470307 Рос. Федерация: МПК G01N33/53, C12Q1/68 / А.В. Козырь, А.В. Колесников, А.Е. Хлынцева, Е.В. Белова, И.Г. Шемякин; заявитель и патентообладатель ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (RU). – опубл. 20.12.2012, Бюл. № 35.
59. Способ получения конъюгированного энтерокина *Escherichia coli*: пат. 1750690 СССР: МКИ 5A61K 39/108 N4788233/13 / Г.В. Гнатенко, Ю.С. Сухарев – заявл. 19.12.89, опубл. 30.07.92, Бюл. №28.2.
60. Справочник биохимика. / Под ред. Р. Досон – М.: Наука, 1991. – 523 с.
61. Терешкина, Н.Е. Конструирование и медицинские испытания моноклональной дот-иммуноферментной тест-системы для детекции туляремийного микроба «ДИАТул-М». / Н.Е. Терешкина, И.В. Терехова, Н.А. Сырова, З.Л. Девдариани, О.Ю. Ляшова, Г.В.Григорьева, О.А. Лобовикова, И.В. Шульгина, И.Л. Иваненко, Н.Б. Захарова, Г.А.Безрукова, В.Ф. Спирин // Пробл. особо опасн. инфекций. – 2013. – Вып. 2. – С. 42-46.

62. Титова, С.В. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006-2015 гг. прогноз на 2016 г. / С.В. Титова, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов, А.В. Самородова, Е.Г. Тюленева, Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, А.С. Водопьянов, И.В. Архангельская, С.М. Иванова, Т.В. Ковалева, С.О. Водопьянов // Пробл. особо опасн. инфекций. – 2016. – Вып. 1. – С. 20-27.
63. Федорова, В.А. Иммуноферментная тест-система для детекции *Vibrio cholerae* O139 серовара. / В.А. Федорова, О.В. Громова, З.Л. Девдариани // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1998. – Вып. 5. – С. 77-80.
64. Шагинян, И.А. Холероподобные энтеротоксины бактерий: методология диагностики. / И.А. Шагинян // Молекул. биол., генетика и иммунобиол. Возбудителей особо опасных инф. Тез. докл. Всесоюз. конф. Ростов-на-Дону.– 1984. – – С. 73-78.
65. Шашкова А. В. Фенотипический и молекулярно-генетический анализ измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара эльтор. [Текст]: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Шашкова Алена Владимировна. – Саратов, 2012. – 131 с.
66. Almeida, R.J. Comparison of a latex agglutination assay and an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting cholera toxin. R.J. Almeida, F.W. Hickman-Brenner, E.G. Sowers, N.D. Puhr, J.J. Farmer, I.K.J. Wachsmuth – Clin. Microbiol. – 1990. – V. 28. – P. 128-130.
67. Arnheim, N. Polymerase chain reaction. / N. Arnheim, C.H. Levenson. // Chemical Engineering News. – 1990. – V. 1. – P. 36-47.
68. Barr, J.R. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. / J.R. Barr, H. Moura, A.E. Boyer, A.R. Woolfitt, S.R. Kalb, A. Pavlopoulos, L.G. McWilliams, J.G. Schmidt, R.A. Martinez, D.L. Ashley // Emerg. Infect. Dis. – 2005. – V. 11. – P. 1578-1583.
69. Basvanna, U. Development of a cell – based functional assay for the detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin types A and E. / U. Basvanna, T. Muruvanda, E.W. Brown, S.K. Sharma // Int. J. of Microbiol. – 2013. doi:10.1155/2013/593219.
70. Berry, P.R. Comparison of latex agglutination and ELISA for the detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in faeces. / P.R. Berry, M.F. Stringer, T. Uemura // Lett. Appl. Microbiology. – 1986. – V. 2. – P. 101-102.

81. Bennett, R.W. Evaluation of polyvalent ELISA's for the identification of staphylococcal enterotoxin in foods. / R.W. Bennett, R.N. Matthews // AOAC International Abstracts – 1995. – V. 17-B-016.
82. Bennett, R. W. Staphylococcus aureus. / R. W. Bennett, G. Ronald, G. Santos // Guide To Foodborne Pathogens Inc, New York. – 2001. – P. 201-220.
83. Bennett, R.W. An Antibody Modified Automated Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Based Method for Detection of Staphylococcal Enterotoxin / R.W. Bennett, J. Rapid // Methods Autom. Microbiol. – 2008. – V. 16. – P. 320-329.
84. Bennett, R. W. Serological Attraction of Nontoxic Egg Component to Staphylococcal Anti-Enterotoxin. / R. W. Bennett // J. Rapid Methods Autom. Microbiol. – 2009. – V. 17. – P. 223-232.
85. Beatty, J.D. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. / J.D. Beatty, B.G. Beatty, W.G. Vlahos // J.Immunol. Methods. – 1987. – V. 100. – P.173-179.
86. Bilitewski, U. Bioresponse-linked instrumental analysis. / U. Bilitewski, G. Brenner-Weiss, P.-D. Hansen // Trends in Analytical Chemistry. – 2000. – V. 19. – P. 428-443.
87. Buchanan, R.L. Evaluation of the Oxoid BCET-RPLA kit for the detection of Bacillus cereus diarrhoeal enterotoxin as compared to cell culture cytotoxicity. . / R.L. Buchanan, F.J. Schultz // J. Food Protection. – 1992. – V. 55. – P. 440-443.
88. Burrous, W. Cholera infection and toxin in the rabbit ilal loop. / W. Burrous, C.M. Musteirir // J. Infect. Dis. – 1966. – V. 116. – 183 p.
89. Buchanan, R.L. Comparison of the TECRA VIA kit, Oxoid BCET-RPLA kit and CHO cell assay for the detection of Bacillus cereus diarrhoeal enterotoxin. / R.L. Buchanan, F.J. Schultz // Letters in Appl. Microbiology. – 1994. – V. 19. – P. 353-356.
90. Burgess, M.N. Biological evaluation of a methanol soluble, heat-stable Escherichia coli enterotoxin the rabbit ileal loop. / M.N. Burgess, R.J. Bywater , C.M. Cowley, N.A. Mullan, P.M. Newsome // Inf. Immunity. – 1978. – V. 21. – P. 526-531.
91. Campos, J. Group A streptococcus culture and direct antigen detection. / J. Campos, H. Isenberg // Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd Edition. Section 3. Washington. ASM Press. 2004.
92. Canto, C.L. / Canto, C.L., Sumita L.M., Machado A.F. // Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. - 2008. - V.50, N.I - P.61-63

93. Carretto, E. *Bacillus cereus* fatal bacteremia and apparent association with nosocomial transmission in an intensive care unit / E. Carretto, D. Barbarini, F. Poletti // *Scand. J. Infect.* – 2000. – №32. – P. 98–100.
94. Christensen, P. New method for the serological grouping of streptococci with specific antibodies adsorbed to protein A-containing staphylococci. / P. Christensen, G. Kahlmeter, S. Jonsson, G. Kronvall // *Infection Immunity.* – 1973. V. 7 – P. 881-885.
95. Christiansson, A. Enterotoxin production in milk by *Bacillus cereus*: a comparison of methods of toxin production. / A. Christiansson // *Netherlands Milk and Dairy J.* – 1993. – V. 7. – P. 79-87.
96. Collins, W.S. Rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. / W.S. Collins, A.D. Johnson, J.F. Metzger, R.W. Bennett // *Appl. Microb.* – 1973. – V. 25. – P. 774-777.
97. Cunniff, P. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16 th ed., AOAC Intern. Inc., Washington. – 1995. – P. 46-48.
98. Datta, N.K. Experimental cholera in Infant Rabbits anethed for chemotherapeutic Investigation. / N.K. Datta, M.K. Habbu // *Br. J. Pharmacol.* – 1955. – V. 10. – 153 p.
99. Dallas, W.D. Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. / W.D. Dallas, S. Falkow // *Nature.* – 1980. – V. 288 – P.499-501.
100. De Haan, L. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review) / L. De Haan, T.R. Hirst // *Mol. Membr. Biol.* – 2004. – V. 21. – № 2. – P. 77-92.
101. *Detection of Cholera Toxin: Laboratory Methods for the Diagnosis of Vibrio cholerae Centers for Disease Control and Prevention Laboratory Methods for the Diagnosis of Vibrio cholerae Centers for Disease Control and Prevention.* – Atlanta, JA, 1994. – P. 62-88.
102. Doellgast, G.J. Enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked coagulation assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E and solution-phase complexes with dual-label antibodies / G.J. Doellgast, G.A. Beard, J.D. Bottoms, M.X. Triscott // *J. Clin. Microbiol.* – 1994. – V. 32. – P. 105-111.
103. Doellgast, G.J. Sensitive enzymelinked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay / G.J. Doellgast, M.X. Triscott, G.A. Beard, J.D. Bottoms, T. Cheng, B.H. Roh, M.G. Roman, P.A Hall, J.E. Brown // *J. Clin. Microbiol.* – 1993. – V. 31. – P. 2402-2409.

104. Drobniowski, F. A. *Bacillus cereus* and Related Species / F. A. Drobniowski // *Clin. Microbiol.* – 1993. – V. 6. – P. 324–338.
105. Edward, J. B. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen / J. B. Edward // *Clinical Microbiology.* – 2010. – V. 23 – P. 382-398.
106. Ekong, T.A. Recombinant SNAP-25 is an effective substrate for *Clostridium botulinum* type A toxin endopeptidase activity in vitro. / T.A. Ekong, I.M. Feavers, D. Sesardic // *Microbiology.* – 1997. – V. 143. – P. 3337-3347.
107. Ekong, T.A. Immunological detection of botulinum neurotoxins. / T.A. Ekong // *Anaerobe.* – 2000. – V. 6. – P. 125-127.
108. ELISA in the clinical microbiology laboratory. / Wreghitt T.G., Morgan-Capner P. – Cambridge: Cambridge University Press, 1991. – 312 p.
109. Engler, K.H. A modified Elek test for detection of toxinogenic *Corynebacteria* in the Diagnostic laboratory./ K.H. Engler, T. Glushkevich, I.K. Mazurova, R.C. George // *J.Clin.Microbiol.* – 1997. – V. 35(2). – P.495-449.
110. Engler K.H., Glushkevich T., Mazurova I.K., George R.C. // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – V. 35. – P. 495-498.
111. Engler, K. H. Immunochromatographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin: description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria. / K.H. Engler, A. Efstratiou, D. Norn, R.S. Kozlov, I.Selga, T.G. Glushkevich, M.Tam, V.G. Melnikov, I.K. Mazurova, V.E. Kim, G.Y. Tseneva, L.P. Titov, R.C. George // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – V. 40. – P. 80-83.
112. Engler, K.H. Rapid enzyme immunoassay for determination of toxigenicity among clinical isolates of *corynebacteria*. / K.H. Engler, A. Efstratiou // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – № 38. – P. 1385-1389.
113. Eubanks, L.M. An in vitro and in vivo disconnect uncovered through high – throughput identification of botulinum neurotoxin A antagonists. / L.M. Eubanks, M.S. Hixon, W. Jin, S. Hong, C.M. Clancy, W.H. Tepp, M.R. Baldwin, C.J. Malizio, M.C. Goodnough, J.T. Barbieri, E.A. Johnson, D.L. Boger, T.J. Dickerson, K.D. Janda // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 2007. – № 104. – P. 2602-2607.
114. Evenson, M.L. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. / M.L. Evenson,

M.W. Hinds, R.S. Bernstein, M.S. Bergdoll // *Int. J. Food Microb.* – 1988. – № 7. – P. 311-316.

115. Faruque, S.M. Analysis of clinical and environmental strains of nontoxigenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTX Φ : molecular basis for origination of new strains with epidemic potential / S.M. Faruque, M.N. Asadulgnani, A.R. Saha, M.A. Alim, M.J. Albert, K.M.N. Islam, J.J. Mekalanos // *Infect. Immun.* – 1998. – V. 66. – № 12. – P. 5819-5825.

116. Faruque, S.M. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* / S.M. Faruque, M.J. Albert, J.J. Mekalanos // *Microbiol. and Molecular Biology Rev.* – 1998 a. – V. 62. – № 4. – P. 1301-1314.

117. Ferreira, L. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. / L. Ferreira, F. Sanchez-Juanes, M. Gonzalez-Avila, D. Cembrero-Fucinos, A. Herrero-Hernandez // *J Clin Microbiol.* – 2010. – V. 48. – № 6. – P. 2110-2115.

118. Friquet, B. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the 2 subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase. / B. Friquet, L. Djavadi-Ohanian, J. Pages // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – V. 60. – P. 351-358.

119. Galfré, G. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. / G. Galfré, S.C. Howe, C. Milstein, G.W. Butcher, J.C. Howard // *Nature.* – 1977. – V. 266. – P. 550.

120. Gasper, E. Quantitative detection of type A staphylococcal enterotoxin by Laurell electroimmunodiffusion. / E. Gasper, R.C. Heimsch, A.W. Anderson // *Appl. Microbiol.* – 1973. – V.25. – № 3. – P. 421-426.

121. Gaunt, P.S. Detection of botulinum type E toxin in channel catfish with visceral toxicosis syndrome using catfish bioassay and endopep mass spectrometry. / P.S. Gaunt, S.R. Kalb, J.R. Barr // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2007. – V. 19. – P.349-354.

122. Ghelardi, E. Swarming behavior of and hemolysin secretion by *Bacillus cereus* / E.Ghelardi, F. Celandroni, S. Salvetti, M. Ceragoli, D. J. Beecher, S. Senesi, A. C. L. Wong // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – №73. – P.4089-4093.

123. Guerrant, R.L. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in-vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and. /

- R.L. Guerrant, L.L. Brunton, T.C. Schaitman, L.L. Gilman, A.G. Gilman // *Inf. Immunity*. – 1974. – V. 10. – P. 320-327.
124. Granum, P.E. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. / P.E. Granum, S. Brynstad, J.M.Kramer // *Int. Food Microbiology*. – 1993. – V. 173. – P. 269-279.
125. Haines, S.D. Brief evaluation of two kits for the detection of Staphylococcal enterotoxins in foods. / S.D. Haines, C.J. Stannard // *Leatherhead Food RA Technical Note Number 76*. – 1987. – Leatherhead, Surrey: Leatherhead Food Research Association.
126. Hallas, G. Detection of diphtheria toxin in culture supernates of *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans* by immunoassay with monoclonal antibody. / G. Hallas, T.G. Harrison, D. Samuel, G. Colman // *J. Med. Microbiol.* – 1990. – V. 32. – P. 247-253.
127. Hindson, B.J. Autonomous detection of aerosolized biological agents by multiplexed immunoassay with polymerase chain reaction confirmation. / B.J. Hindson, M.T. McBride, A.J. Makarewicz, B.D. Henderer, U. S. Setlur, S. M. Smith, D. M. Gutierrez, T. R. Metz, S. L.Nasarabadi, K. S. Venkateswaran, S. W. Farrow, B. W. Colston, J. M. Dzenitis // *Anal. Chem.* – 2005. – V.77. – № 1. – P. 284–289.
128. Ho, J.A. Application of ganglioside-sensitized liposomes in a flow injection immunoanalytical system for the determination of cholera toxin. / J.A. Ho, L.C. Wu, M.R. Huang, Y.J. Lin, A.J. Baeumner, R.A. Durst // *Anal. Chem.* – 2007. – V. 79. – № 1. – P. 246-250.
129. Holmes, R.K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the *tox* gene. / R.K. Holmes // *J. Inf. dis.* – 2000. – V. 181.– Suppl. 1. —P. 156-167.
130. Honda, T. A simple test to detect *Escherichia coli* producing heat-labile enterotoxin: results of a field study of the Biken test in Bangladesh. / T. Honda, Q. Akhtar, R.I. Glass, A.K. Kibriya // *Lancet*. – 1981. – V. 2. – P. 609-610.
131. Honda, T. Differential detection of cholerae enterotoxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assays with antibodies specific to the two toxins. / T. Honda, M. Sato, T. Miwatani // *J. Clin. Microbiol.* – 1984. – V. 20. – P. 664-667.
132. Immuno-polymerase chain reaction system for antigen detection. Pat. US5665539 A: US 08/131,301 / Takeshi Sano, Charles R. Cantor, Cassandra L. Smith; The regents of the University of California. 04.10.93.

133. Iwanaga, M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. M. Iwanaga, K. Yamamoto, N. Higa, Y. Ichinose, N. Nakasone, M. Tanabe // *Microbiol. Immunol.* – 1986. – V. 30 – № 11. – P. 1075-1083.
134. Jalgaonkar, S.V. Coagglutination for rapid testing of toxin producing *Corynebacterium diphtheria*. / S.V. Jalgaonkar, A.M. Saoji // *Indian J. Med. Res.* – 1993. – V. 97. – P. 35-36.
135. Jay, J.M. Bioassay and related methods. In *Modern Food Microbiology*. / J.M. Jay // New York: Chapman and Hall. – 1996. – P. 257-270.
136. Johnson, H.M. Enterotoxin B: serological assay by passive haemagglutination. / Johnson H.M., Hall H.E., Simon M. // *Appl. Microbiology*. – 1967. – V. 16. – P. 1019-1023.
137. Jung, M.Y. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a New Member of the *Bacillus cereus* Group Isolated from Foreshore Tidal Flat Sediment / M. Y. Jung, J. Su Kim, W. K. Paek, J. Lim, H. Lee, P. I. Kim, J. Y. Ma, W. Kim, Y. Hyo Chang // *J. Microbiology*. – 2011. – V. 49. – №.6. – P. 1027-1032.
138. Kalb, S.R. The use of Endopep-MS for the detection of botulinum neurotoxins A, B, E and F in serum and stool samples. / S.R. Kalb, H. Moura, A.E. Boyer // *Anal. Biochem.* – 2006. – V. 351. – № 1. – P. 84-92.
139. Kaper, J.B. Cholera / J.B. Kaper, J.G. Morris, M.M. Levine // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1995. – V. 8. – P. 48-86.
140. Katussevani, B. Concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. / B. Katussevani, N. Pakulat, S. Flier // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2004. – V. 48. – № 48. – P. 546-555.
141. Kiessing, S.T. A solid-phase enzyme immunoassay for the detection of tetanus toxin using human and murine monoclonal antibodies. / S.T. Kiessing, C. Hentschel, S. Jahn, M. Mehl, R. Starke, T. Porstmann // *J. Basic Microbiol.* – 1991. – V. 31. – № 2. – P. 1578-1583.
142. Kobiler, D. Protectigen as a correlative marker for anthrax in animal models. / D. Kobiler, S. Weiss, H. Levy, M. Fisher, A. Mechaly, A. Pass, Z. Altboum // *Infect. Immun.* – 2006. – V. 74. – № 10. – P. 5871-5876.
143. Komatsu, M. Tumour necrosis factor alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive Immuno-PCR. / M. Komatsu, D. Kobayashi, K. Saito. // *Clin. Chem.* – 2001. – V. 47. – № 7. – P. 1297-1301.
144. Kramer, J.M. Identification and characterization of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species associated with foods and food poisoning. / J.M. Kramer, P.C.B. Turnbull, G. Munshi

- G., R.J. Gilbert // In: Isolation and Identification Methods for Food-poisoning Organisms (J.E.L. Corry, D. Roberts, F.A. Skinner) – 1982. – P. 261-285.
145. Kull, S. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. / S. Kull, D. Pauly, B. Sturmman, S. Kirchner, M. Stammler, M.B. Dorner, P. Lasch, D. Naumann, B.G. Dorner // *Anal. Chem.* – 2010. – V. 82. – № 7. – P. 2916-2924.
146. Laemmly, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. / Laemmly U.K. // *Ibid.* – 1970. – V. 227. – P. 680-685.
147. Laurell, C.B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. / C.B. Laurell // *Anal. Biochem.* – 1966. – Vol. 15. – P. 45-52.
148. Ler, S.G. Trends in detection of warfare agents: Detection methods for ricin, staphylococcal enterotoxin B and T-2 toxin. / S.G. Ler, F.K. Lee, P. Gopalakrishnakone // *J. Chromatogr. A.* – 2006. – V. 1133. – № 1-2. – P. 1-12.
149. Lindroth, S. Double antibody solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. / S. Lindroth, A. Niskanen // *European J. Appl. Microb.* – 1977. – V. 4. – P.137-143.
150. Lindstrom, M. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in food and fecal material. / M. Lindstrom, R. Keto, A. Markkula, M. Nevas, S. Hielm, H. Korkeala // *Appl. Environ Microbiol.* – 2001. – V. 67. – P.5694-5699.
151. Lindstrom, M. Laboratory diagnostics of botulism. / M. Lindstrom, H. Korkeala // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2006. – V. 19. – P.298-314.
152. Lindstrom, M. Thermal inactivation of nonproteolytic *Clostridium botulinum* type E spores in model fish media and in vacuum-packaged hot-smoked fish products. / M. Lindstrom, M. Nevas, S. Hielm, L. Lshteenmaki, M.W. Peck, H. Korkeala // *Appl. Environ Microbiol.* – 2003. – V. 69. – P.4029-4036.
153. Lingood, M.A. *Escherichia coli*: detection of enterotoxins. In Isolation and Identification Methods for Food-Poisoning Organisms, SAB Technical Series № 17. / M.A. Lingood, J.E.L. Correy, D. Roberts, F.A. Skinner. – 1982. – P. 227-237.
154. Lovett, J. Detection of *Escherichia coli* enterotoxins by mouse adrenal cell and suckling mouse assays: collaborative study. / J. Lovett, J.T. Peeler // *J. of the Association of Official Analytical Chemists.* – 1984. – V. 67. – P. 946-949.

155. Mekalanos, J.J. Purification of cholera toxin and its subunits: New methods of preparation and the use of hypertoxinogenic mutants. / Mekalanos J.J., Collier R.J., Roming W.R. // *Infect. Immun.* – 1978. – V. 20. – N 2. – P. 552.
156. Melling, J. Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. / J. Melling, B.J. Turnbull, P.C.B. Gilbert, R.J. Gilbert // *J. Clin. Pathology.* – 1976. – V. 29. – P. 938-940.
157. McBride, M.T. Autonomous Detection of Aerosolized *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*. / M.T. McBride, D. Maksquelier, B.J. Hindson, A.J. Makarewicz, S. Brown // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75. – № 20. – P. 5293-5299.
158. Mousavi, S.L. Rapid screening of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from south Iran by PCR-ELISA. / S.L. Mousavi, S. Nazarian, J. Amani, A.K. Rahgerdi // *Iran Biomed. J.* – 2008. – V. 12. – № 1. – P. 15-21.
159. Saiki, R.K. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. / R.K. Saiki, Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. // *Science.* – 1985. – V. 230. – P.1350-1354.
160. Murray, P.R. What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. / P.R. Murray // *J. Mol. Diagn.* – 2012. – № 5. – P.419-423.
161. Nedelkov, D. Multitoxin biosensormass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food. / D.Nedelkov, A. Rasooly, R.W. Nelson // *Int. J. Food Microbiol.* – 2000. – V. 60. – P. 1-13.
162. Nedelkov, D. Detection of Staphylococcal enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry D. Nedelkov, R.W. Nelson // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69. – N 9 – P. 5212-5215.
163. Nedelkov, D. Population proteomics: the concept, attributes, and potential for cancer biomarker research. / D. Nedelkov, U.A. Kiernan, E.E. Niederkofler, K.A. Tubbs, R.W. Nelson // *Molecular Cellular Proteomics.* – 2006. – V. 5. – №10. – P. 1811-1888.
164. Notermans, S. Characterisation of *Bacillus cereus* in relation to toxin production. / S. Notermans, S. Tatini // *Netherlands Milk and Dairy J.* – 1993. – V. 47. – P. 71-77.
165. Pappenheimer, A.M. Diphtheria toxin. / A.M. Pappenheimer // *Annu. Rev. Biochem.* – 1977. – V. 46. – P. 69-94.

166. Petosa, C. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. / C. Petosa, R.J. Collier, K.R. Klimpel // *Nature*. – 1997. – V. 385. – № 6619. – P.833-838.
167. Pietrzak, J. Sandwich-dot immunobinding assay (Sandwich-DIA), a new immunological method for the detection of diphtheria toxin. / J. Pietrzak, S. Muehlestein, M.Gasser // *Zbl. Bakt.* –1990. – V. 274. – P. 61-69.
168. Poli, M.A. Detection of ricin by colorimetric and chemiluminescence ELISA / M.A.Poli, V.R. Rivera, J.F. Hevetson, G.A. Merril. // *Toxicon*. – 1994. – V. 32. – P. 1371-1377.
169. Poli, M.A. Sensitive and specific colorimetric ELISAs for *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B in urine and buffer / M.A. Poli, V.R. Rivera, D. Neal. // *Toxicon*. – 2002. – V.40. – P. 1723-1726.
170. Prod'hom, G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. / G. Prod'hom, A. Bizzini, C. Durussel, J. Bille, G.Greub // *J Clin Microbiol.* . – 2010. – V. 48 №4. – P. 1481-14813.
171. Reeves, M.W. Affinity purification of staphylococcal toxic shock syndrome toxin and pathologic effects in rabbits. / M.W. Reeves, R.V. Arko, F.W. Chandler, N.B. Bridges // *Infect. Immun.* – 1986. –V. 51. – P. 431-439.
172. Roman, M.G Amplified immunoassay ELISA-ELCA for measuring *Clostridium botulinum* type E neurotoxin in fish fillets / M.G Roman, J.Y. Humber, P.A. Hall, N.R. Reddy, H.M. Solomon, M.X. Triscott, G.A. Beard, J.D. Bottoms, T. Cheng, G.J. Doellgast // *J. Food Prot.* – 1994. – V. 57. – P. 985-990.
173. Rolf, J.M. Structure function analyses of diphtheria toxin by use of monoclonal antibodies. / J.M. Rolf. // *Infect. Immun.* – 1993. – V. 61. – № 3. – P. 994-1003.
174. Rose, S.A. Detection of staphylococcal toxin in dairy products by the reversed passive latex agglutination (SET-RPLA). / S.A. Rose, P. Banks, M.F. Stringer // *Int. J. Food Microb.* – 1989. – V. 8. – P. 65-72.
175. Rubina, A.Yu. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. / A.Yu. Rubina, V.I. Dyukova, E.I. Dementieva, A.A. Stomakhin, V.A. Nesmeyanov, E.V. Grishin, A.S. Zasedatelev // *Anal. Biochem.* – 2005. – V.340. – P.317-329.
176. Sanchez, J. Expression of Cholerae Toxin under Non-AKI conditions in *Vibrio cholerae* El Tor Induced by Increasing the Exposed Surface of Cultures. / J. Sanchez, G. Medina,

- T. Buhse, J. Holmgren, G. Soberon-Chavez // *J. Bacteriology*. – 2004. – V. 186. – № 5. P. 1355-1361.
177. Scarlatos, A., Welt B., Cooper B. // *J. Food. Sci.* – 2005. – V. 70 (8). – P. 121-124.
178. Scotcher, M.C. Development and characterization of six monoclonal antibodies to hemagglutinin-70 of *Clostridium botulinum* and their application in a sandwich ELISA. / M.C. Scotcher, L.W. Cheng, K. Ching, J. McGarvey, R. Hnasko, L. Stanker // *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* – 2013. – V. 32. – P. 6-15.
179. Schlessinger, D. Bacterial toxins / D. Schlessinger, M. Schaechter, G. Medoff, B.I. Eisenstein // *Mechanisms of microbial disease*. 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins. – 1993. – P. 162-175.
180. Schlosser, G. Coupling immunomagnetic separation on magnetic beads with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for detection of staphylococcal Enterotoxin B. / G. Schlosser, P. Kacer, M. Kuzma, Z. Szilagy, A. Sorrentino, C. Manzo, R. Pizzano, L. Malorni, G. Pocsfalvi // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 73. – № 21 – P. 6945-6952.
181. Scotland, S.M. Identification of *Escherichia coli* that produces heat-stable enterotoxin STA by a commercially available enzyme-linked immune assay and comparison of the assay with infant mouse and DNA probe tests. / S.M. Scotland, G.A. Willshaw, B. Said, B. Rowe // – 1989. – V. 27. – P. 1697-1699.
182. Sesardic, D. Refinement and validation of an alternative bioassay for potency testing of therapeutic botulinum type A toxin. / D. Sesardic, K. McLellan, T.A. Ekong, R.G. Dass // *Pharmacol Toxicol.* – 1996. – V. 78. – P. 283-288.
183. Smith, L.D.S. Botulism. The organism, its toxins, the disease. 2 nd. – L.D.S. Smith, H. Sugiyama. – Charles C Thomas, Springfield III.
184. Speirs, J.I. Assessment of two commercial agglutination kits for detecting *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin / J.I. Speirs, S. Stavric, B. Buchanan // *Canadian J. of Microb.* – 1991. – V. 37. – P. 877-880.
185. Speirs, J.I. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero cells / J.I. Speirs, S. Stavric, J. Konolwalchuk // *J. Inf. Immun.* – 1977. – V. 16. – P. 617-622.
186. Shapiro, R.E. Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand. / R.E. Shapiro, C.D. Specht, B.E. Collins, A.S. Woods, R.J. Cotter, R.L. Schnaar // *J. Biol. Chem.* – 1977. – V. 272. – № 48. – P. 30380-30386.

187. Shields, S.J. Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes: confirmation of binding sites and changes in tertiary structure. / S.J. Shields, O. Oyeyemi, F.C. Lightstone, R. Balhorn // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2003. – V. 14. – № 5. – P. 460-470.
188. Shone, C. Monoclonal antibody-based immunoassay for type A *Clostridium botulinum* toxin is comparable to the mouse bioassay. / C. Shone, P. Wilton-Smith, N. Appleton // *Appl. Environmental Microb.* – 1985. – V. 50. – P. 63-67.
189. Sun, D. Antibodies directed against the toxin-coregulated pilus isolated from *Vibrio cholerae* provide protection in the infant mouse experimental cholera model. / D. Sun, J.J. Mekalanos, R.K. Taylor // *J. Infect. Dis.* – 1990. – V. 161. – P. 1231-1236.
190. Stevens, D.L. Group A beta-haemolytic streptococci: virulence factors, pathogenesis and spectrum of clinical infections. / D.L. Stevens, E.L. Kaplan // *Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology and molecular pathogenesis.* Oxford university press. – 2000.
191. Stevens, D.L. Severe group A streptococcal infections associated with a toxic shock-like syndrome and scarlet fever toxin A. / D.L. Stevens, M.H. Tanner, J. Winship, R. Swarts, K.M. Ries, P.M. Schlievert, E. Kaplan // *Reviews of Infectious Diseases.* – 1989. – 321. – P. 1-7.
192. Thompson, N.E. Detection of staphylococcal enterotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays and radioimmunoassays: comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems/ N.E. Thompson, M. Razdan, G. Kunstmann J.M. Aschenbach, M.L. Evenson, M.S. Bergdoll. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1986. – V.51. – P.885-890.
193. Toma, S. Reversed passive latex agglutination assay for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. / S. Toma, L. Sisvath, M. Iwanaga // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – P. 3147-3149.
194. Torii, Y. Quantitative determination of biological activity of botulinum toxins utilizing compound muscle action potentials (CMAP), and comparison of neuromuscular transmission blockage and muscle flaccidity among toxins. / Y. Torii, Y. Goto, M. Takahashi, S. Ishida, T. Harakawa, T. Sakamoto, R. Kaji, S. Kozaki, A. Ginnaga // *Toxicon.* – 2009. – V. 55. – P. 407-414.
195. Tranter, H.S. Monoclonal antibodies directed against *Clostridium perfringens* type A enterotoxin with potential use in characterizing and detecting the enterotoxin. / H.S. Tranter, D. Reynolds, P. Wilton-Smith, L.A. Obosi, P. Hambleton. // *Zentralblatt für bakteriologie mikrobiologie und hygiene.* – 1986. – Suppl. 15. – P. 397-398.

196. Tuteja, U. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. / U. Tuteja, S. Kumar, J. Shukla // *J. Med. Microbiol.* – 2007. – V. 56. – P. 1340-1345.
197. Usuki, S. Chemical validation of molecular mimicry: interaction of cholera toxin with *Campylobacter* lipooligosaccharides. / S. Usuki, M. Pajaniappan, S. A. Thompson, R.K. Yu // *Glycoconj. J.* – 2007. – V. 24. – № 2-3 – P. 167-180.
198. Van Weemen, M.B. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. / M.B. Van Weemen, A.H. Schuurs // *FEBS Letters.* – 1971. – V. 15. – P. 232-236.
199. VET-RPLA toxin detection kit. OXOID manual. – 2006. – 9-th edition compiled by E.Y. Bridson. – P. 1039-1042.
200. Wheeler, C. Sensitivity of mouse bioassay in clinical wound botulism. / C. Wheeler, G. Inami, J. Mohle-Boetani, D. Vugia. // *Clin.Infect.Dis.* – 2009. – V. 48. – P. 1669-1673.
201. Wienke, A.A. Comparison of four kits for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. / A.A. Wienke // *International J. Food Microb.* – 1991. – V. 14. – P. 305-312.
202. Wilson, M.B. Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. / M.B. Wilson, Nakane P.K. // *Immunofluorescence and Related Staining Techniques.* – 1978. – P. 215-244.
203. Wolcott, M.J. Advances in nucleic acid-based detection methods. / M.J. Wolcott, Wyatt G.M. // *Clinical Microbiology Reviews.* – 1992. – V. 5. – P. 370-386.
204. World Health Organization [Internet] Cholerae surveillance and number of case. Geneva: WHO; 2014. <http://www.who.int/features/2014/health-crisis-south-sudan/ru/>
205. Yonekita, T. Simple, rapid, and reliable detection of *Escherichia coli* O26 using immunochromatography. / T. Yonekita, T. Fujimura, N. Morishita, T. Matsumoto, F. Morimatsu // *Journal of Food Protection.* – 2013. – V. 76. – №5. – P. 748-754.