

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-100-105

УДК 616.932(665.2)

Д.В. Уткин¹, Е.В. Найденова¹, К.А. Никифоров¹, А.В. Бойко¹, Д.А. Агафонов¹, М.Н. Ляпин¹,
А.А. Лопатин², I. Bangoura³, T.D. Camara³, S. Boumbaly³, M.Y. Boiro³**ИЗУЧЕНИЕ ИММУННОЙ ПРОСЛОЙКИ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ХОЛЕРЫ У ЛИЦ, ПРОЖИВАЮЩИХ
НА ТЕРРИТОРИИ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;²ФКУЗ «Противочумный центр», Москва, Российская Федерация;³Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика

Для достоверной оценки наличия иммунной прослойки к возбудителю холеры необходимым является определение уровня специфических антител в сыворотке крови людей. Для выявления специфических противохолерных антител применяют серологические методы, направленные на выявление агглютинирующих, вибриоцидных и токсиннейтрализующих антител. В то же время указанные методы имеют ряд существенных недостатков, которые могут быть устранены при использовании биологических микрочипов, направленных на выявление специфических антител. **Цель работы** – оценка уровня формирования иммунной прослойки к возбудителю холеры у лиц, проживающих на территории Гвинейской Республики, с использованием биологического микрочипа. **Материалы и методы.** Исследовано 190 образцов сывороток крови людей, проживающих на территории трех провинций Гвинейской Республики. Образцы собраны в период с мая по октябрь 2016 г. Выявление специфических антител к антигенам *V. cholerae* осуществляли с использованием иммуночипа в непрямом анализе. В качестве специфических антигенов для сенсibilизации поверхности иммуночипа использовали О-антигены *V. cholerae* и холерный токсин. **Результаты и обсуждение.** В результате анализа с применением иммуночипа специфические антитела к О1 и О139 антигенам холерных вибрионов ни в одном из случаев не выявлены. В то же время в 66 исследованных пробах (34,7 %) обнаружены антитела к холерному токсину, из них в 59 образцах – в титре 1:100, в одном – в титре 1:400, в двух – в титре 1:800, в четырех образцах – в титре 1:1600. Отмечено отсутствие статистически значимых различий в зависимости от половой принадлежности обследованных и территории их проживания. Полученные результаты можно объяснить тем, что антитела к холерному токсину циркулируют в сыворотке крови человека более длительное время, чем антитела, специфичные к О1 и О139 антигенам холерного вибриона. Проведенные исследования продемонстрировали наличие в сыворотках антител класса IgG, комплементарных к холерному токсину, что может свидетельствовать как о контакте населения с возбудителем холеры, так и о формировании поствакцинального иммунитета.

Ключевые слова: иммунная прослойка, холера, серологическая диагностика, антитела, иммуночип, Гвинейская Республика.

Корреспондирующий автор: Уткин Денис Валерьевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Уткин Д.В., Найденова Е.В., Никифоров К.А., Бойко А.В., Агафонов Д.А., Ляпин М.Н., Лопатин А.А., Bangoura I., Camara T.D., Boumbaly S., Boiro M.Y. Изучение иммунной прослойки к возбудителю холеры у лиц, проживающих на территории Гвинейской Республики. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:100–105. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-100-105

D.V. Utkin¹, E.V. Naidenova¹, K.A. Nikiforov¹, A.V. Boiko¹, D.A. Agafonov¹, M.N. Lyapin¹,
A.A. Lopatin², I. Bangoura³, T.D. Camara³, S. Boumbaly³, M.Y. Boiro³**The Study of the Immune Layer to the Cholera Agent in Individuals Living in the Republic of Guinea**¹Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation; ²«Plague Control Center», Moscow, Russian Federation; ³Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea

Abstract. For a reliable assessment of the presense of the immune layer to cholera agent, it is necessary to determine the level of specific antibodies in human blood serum. To detect specific anti-cholera antibodies serological methods are used, aimed to identify agglutinating, vibriocidal and toxin neutralizing antibodies. At the same time, the stated methods have several drawbacks which can be eliminated when using biological microarrays to detect specific antibodies. **Object of work.** Assessment of the level of the immune layer to cholera agent in individuals residing in the territory of the Republic of Guinea, using a biological microchip. **Materials and methods.** 190 blood serum samples of people living on the territory of three provinces of the Republic of Guinea, collected over the period of May–October 2016 were studied. The detection of specific antibodies to antigens of *V. cholerae* was performed using the immunochip for serodiagnosis in the indirect analysis. *V. cholerae* O-antigens and cholera toxin were used as specific antigens for sensibilization of the immunochip surface. **Results and discussion.** As a result of the analysis, using immunochip, specific antibodies to O1 and O139-antigens of *V. cholerae* at the titer of 1:100 were not detected in any of the cases. At the same time, antibodies to cholera toxin were found in 66 samples (34.7 %); titers varied from 1:100 to 1:1600, being 1:100 in 59 samples, 1:400 – in 1 sample, 1:800 – in 2 samples, 1:1600 – in 4 samples. The absence of statistically significant differences depending on the gender of the examined people and the territory of their residence was noted. The obtained results can be explained by the fact that antibodies to cholera toxin are more resistant and circulate longer in human serum than antibodies to O-antigens. Studies have demonstrated the presence of IgG antibodies complementary to cholera toxin in sera, which may indicate both the contact of the population with the cholera pathogen and the formation of post-vaccinal immunity.

Keywords: immune layer, cholera, serological diagnostics, antibodies, immunochip, Republic of Guinea.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Denis V. Utkin, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Utkin D.V., Naidenova E.V., Nikiforov K.A., Boiko A.V., Agafonov D.A., Lyapin M.N., Lopatin A.A., Bangoura I., Camara T.D., Boubaly S., Boiro M.Y. The Study of the Immune Layer to the Cholera Agent in Individuals Living in the Republic of Guinea. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:100–105. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-100-105

Received 01.08.19. Revised 26.08.19. Accepted 02.09.19.

В настоящее время сохраняется напряженная обстановка по холере. Ежегодно в мире заболевает в среднем 100–300 тыс. человек [1]. В 2017–2018 гг. наблюдались серьезные эпидемии холеры в Йемене, Сомали, Демократической Республике Конго, Нигерии, Южном Судане [1, 2]. Холера является эндемичным заболеванием для многих стран Западной Африки (Нигерия, Бенин, Того, Гана, Либерия, Гвинея), где регистрируются как крупные вспышки данной инфекции, так и спорадические случаи заболевания людей. В 2012 г. в Гвинейской Республике зарегистрирована крупная вспышка холеры – 7350 случаев, в том числе 133 летальных, в 2013 г. в стране зарегистрировано 319 случаев заболевания холерой [3]. Одним из сдерживающих факторов распространения холерной инфекции является проведение своевременных противоэпидемических и профилактических мероприятий. С целью предупреждения заболеваний холерой в стране проведена массовая вакцинация местного населения [3]. В контексте оценки уровня формирования иммунной прослойки на территории регионов, где регистрировали случаи холеры и проводилась массовая вакцинация, важно знать, какая доля людей имеет специфические антитела к возбудителю холеры. Из-за неоднократных инфекций бактериальными энтеропатогенами, вырабатывающие энтеротоксины, сходные по своей природе и структуре с холерным токсином [4], у людей, проживающих в условиях с низким уровнем санитарии, могут наблюдаться антитоксические антитела [5], что затрудняет достоверную оценку формирования иммунной прослойки.

Для выявления специфических противохолерных антител применяют серологические методы, направленные на выявление агглютинирующих, вибриоцидных и токсиннейтрализующих антител [6]. В большинстве случаев для выявления антител к возбудителю холеры в сыворотке крови человека используется развернутая реакция агглютинации (РА) со штаммами *Vibrio cholerae* O1 (серовары Огава и Инаба) и O139 серогрупп [6]. Применение регламентированного метода определения токсиннейтрализующих антител в реакции пассивной гемагглютинации в настоящее время затруднено из-за отсутствия зарегистрированных диагностических препаратов. Рекомендуемые для выявления противотоксических антител реакции двойной иммунодиффузии в геле, иммуноэлектрофореза [7] характеризуются низкой чувствительностью (5–100 мкг/мл антител) [8]. Длительность времени анализа объемной реакции агглютинации (18 ч), необходимость применения в иммунохимических реакциях штаммов холерных вибрионов, низкая чув-

ствительность агглютинационных тестов, отсутствие диагностических препаратов создают определенные трудности при проведении мониторинговых исследований и эпидемиологического анализа и обуславливают актуальность разработки иммунодиагностических препаратов, обеспечивающих высокую производительность, информативность и быстроту выполнения проводимого анализа. Таким требованиям удовлетворяют тест-системы, созданные на основе иммунологических биочипов (иммуночипов), по своей чувствительности приближенные к методу иммуноферментного анализа (10 нг/мл) [8, 9].

Ранее разработан биологический микрочип для выявления противохолерных антител в сыворотке крови человека [10]. Биологический микрочип содержит О-антигены *V. cholerae* O1 серогруппы сероваров Огава, Инаба, O139 серогруппы и термолабильный холерный токсин (ХТ). В иммунологическом анализе с использованием гомо- и гетерологичных сывороток, а также сывороток крови людей, больных холерой, установлена 100 % диагностическая чувствительность и специфичность данного иммуночипа с возможностью выявления антител классов G и M к указанным антигенам [11].

Целью данной работы является оценка уровня формирования иммунной прослойки к возбудителю холеры у лиц, проживающих на территории Гвинейской Республики, с использованием биологического микрочипа.

Гвинейская Республика относится к странам, где периодически регистрируются как крупные вспышки холеры (2012 г.), так и спорадические случаи заболевания людей [12, 13]. С целью предупреждения заболевания холерой в стране проведена массовая вакцинация местного населения [3]. Для оценки эффективности вакцинации населения в Институте Пастера разработан иммунохроматографический тест для выявления циркулирующих в крови антигенов – липополисахаридов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп [14]. Однако указанный тест не позволял оценить уровень образования специфических антител.

Материалы и методы

Исследования проводили российские и гвинейские специалисты на базе Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи (Киндия, Гвинейская Республика).

Для анализа сформирована панель из 190 сывороток крови людей, проживающих на территории трех провинций Гвинейской Республики (Kindia,

Mamou, Faranah), где ранее отмечались случаи заболевания холерой с последующей массовой вакцинацией [3, 12]. Образцы крови собраны в период с мая по октябрь 2016 г. от людей, не имеющих симптомов острых кишечных инфекций. Подготовку сывороток к работе осуществляли в соответствии с МУК 4.2.2315-08 [6]. Для выявления противохолерных антител в качестве метода сравнения использовали микрометод РА [6].

Для определения противохолерных антител применяли ранее разработанный биологический микрочип [10, 11], представляющий собой стеклянный слайд с аминомодифицированной поверхностью (Corning, США), на котором иммобилизовали очищенные специфические О-антигены *V. cholerae* и ХТ, предоставленные к.м.н. О.В. Громовой и к.б.н. Т.Л. Захаровой (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Для исключения ложноположительных реакций с антителами к токсинам *Escherichia coli*, в панель антигенов иммуночипа включили препарат термолабильного энтеротоксина *E. coli* (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

Антигены наносили на слайды в трех повторях методом контактной печати с использованием персонального миниплоттера «ХастMicroarrayer» (LabNEXT, США). Препараты антигенов разводили в сорбционном буфере до конечной концентрации 1 мг/мл. При печати набор антигенов группировали в виде 16 идентичных зон – эрреев (рис. 1).

Сорбцию антигенов проводили в течение 1 ч при температуре 37 °С. Свободные сайты связы-

вания поверхности стекла блокировали 0,5 % раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в течение 30 мин при температуре 37 °С с последующей отмывкой фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ). Для проведения анализа на одном слайде нескольких образцов на слайд накладывали 16-луночную инкубационную камеру (Whatman, Великобритания), формирующую 16 лунок, соответствующих 16 эрреям биочипа. Слайд с инкубационной камерой фиксировали в рамке-держателе (Whatman, Великобритания).

Исследуемые сыворотки разводили в ФСБ 1:100 и вносили в лунки биологического микрочипа в объеме 100 мкл. Сыворотки инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С на термошейкере при скорости вращения платформы 300 об./мин. После инкубации слайды дважды отмывали ФСБ. Затем в лунки биочипа вносили по 100 мкл конъюгата анти-видовых козьих антител в рабочем разведении 1:500, меченых AlexaFluor 633 и AlexaFluor 647 (Invitrogen, США), направленных против иммуноглобулинов человека классов G и M соответственно, после чего проводили инкубацию в течение 30 мин при температуре 37 °С на термошейкере при скорости вращения платформы 300 об./мин. Слайды дважды отмывали ФСБ и дистиллированной водой. Высушивание биочипа осуществляли путем центрифугирования в центрифужных пробирках объемом 50 мл в течение 1 мин при скорости вращения ротора 1000 об./мин.

Результаты тестирования сывороток регистрировали с помощью флуоресцентного сканера «GenePix 4100A» (Molecular Devices, США). Результат считали положительным при превышении уровня флуоресценции в исследуемой зоне в 2 раза выше уровня флуоресценции отрицательного контроля. В качестве отрицательного контроля использовали ФСБ. Сыворотки, в которых выявлены антитела к антигенам возбудителя холеры, в последующем титровали от 1:100 до 1:1600 с целью определения титра антител.

При статистической обработке материала рассчитывали долю серопозитивных образцов в каждой выборке с 95 % доверительными интервалами по методу Уилсона [15] с использованием онлайн-калькулятора VassarStats: Web Site for Statistical Computation [<http://vassarstats.net/prop1.html>].

Результаты и обсуждение

По результатам анализа в РА, агглютинирующие антитела к возбудителю холеры в исследуемых сыворотках не обнаружены. В виду отсутствия регламентированных средств выявления антитоксических антител оценку их наличия проводили только с применением экспериментального иммуночипа.

В результате проведенных исследований с использованием иммуночипа антитела классов G и M к О-антигенам *V. cholerae* и к термолабильному энтеротоксину *E. coli* в исследуемых сыворотках не выявлены. В то же время в 66 образцах (34,7 % с до-

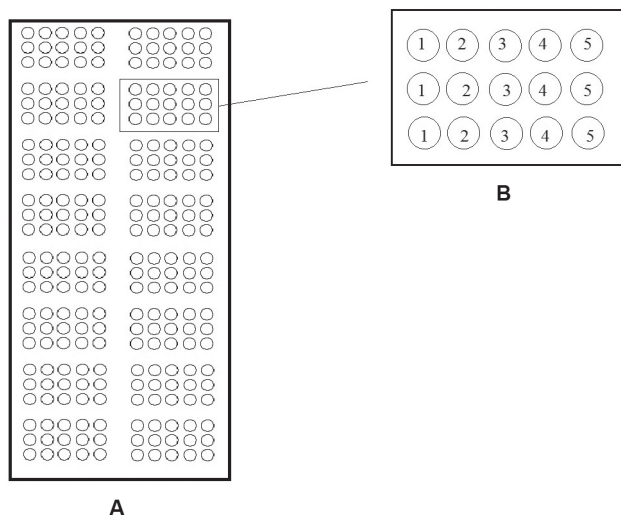


Рис. 1. Расположение антигенов на слайде (А) и в пределах одного эррея (В):

1 – О1-антиген *V. cholerae* Огава, 2 – О1-антиген *V. cholerae* Инаба, 3 – О-антиген *V. cholerae* О139, 4 – термолабильный энтеротоксин *E. coli*, 5 – холерный токсин

Fig. 1. Position of antigens in the slide (А) and within the limits of one array (В):

1 – O1-antigen of *Vibrio cholerae* serovar Ogawa, 2 – O1-antigen of *Vibrio cholerae* serovar Inaba, 3 – O-antigen of *Vibrio cholerae* O139, 4 – thermolabile enterotoxin of *E. coli*, 5 – cholera toxin

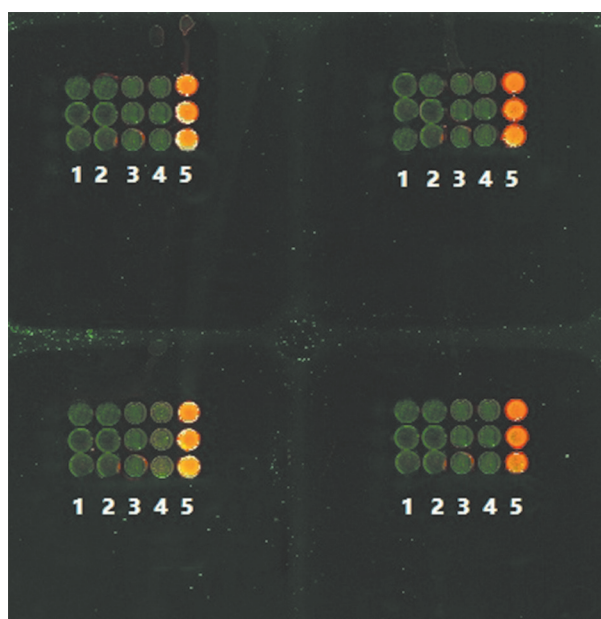


Рис. 2. Флуоресцентный профиль четырех образцов сывороток крови:

1 – O1-антиген *V. cholerae* Огава, 2 – O1-антиген *V. cholerae* Инаба, 3 – O-антиген *V. cholerae* O139, 4 – термолabile энтеротоксин *E. coli*, 5 – холерный токсин

Fig. 2. Fluorescent profile of four blood sera samples:

1 – O1-antigen of *Vibrio cholerae* serovar Ogawa, 2 – O1-antigen of *Vibrio cholerae* serovar Inaba, 3 – O-antigen of *Vibrio cholerae* O139, 4 – thermolabile enterotoxin of *E. coli*, 5 – cholera toxin

верительным интервалом 28,3–41,8 %) обнаружены антитела класса IgG, специфически реагирующие с ХТ (рис. 2).

В зависимости от района исследования доля проб, содержащих антитела к ХТ, колебалась от 29,1 до 53,3 % (таблица).

Выраженная трансгрессия доверительных интервалов свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий доли серопозитивных образцов в различных районах сбора материала (рис. 3).

Антитела к холерному токсину встречались в сыворотках крови у женщин в 42 случаях из 115 (36,5 %, доверительный интервал 28,3–45,6 %), у мужчин в 24 случаях из 75 (32,0 %, доверительный интервал 22,5–43,2 %). Отмечено отсутствие статистически значимых различий в зависимости от половой принадлежности обследованных. Наибольшая частота встречае-

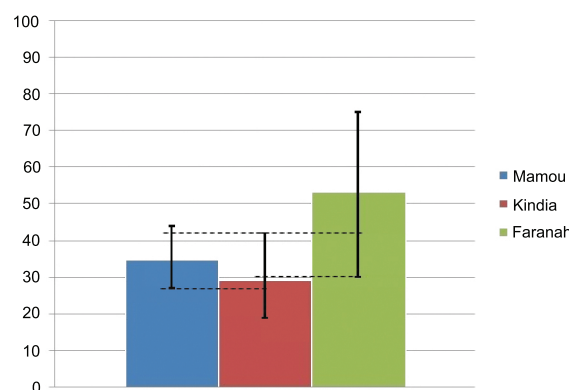


Рис. 3. Доля серопозитивных проб (%) с указанием 95 % доверительного интервала. Штриховой линией указаны границы трансгрессии

Fig. 3. The share of seropositive samples (%) with indication of 95 % confidence interval. Dashed line shows transgression edges

мости положительных проб наблюдалась в возрастной группе 25–35 лет – 34,9 % от всех положительных проб с доверительным интервалом 24,5–46,9 %.

В дальнейшем сыворотки, в которых выявлены антитела к холерному токсину, исследованы в разведении от 1:100 до 1:1600. По результатам анализа, титр антител составил 1:100 – в 59 образцах, 1:400 – в одном, 1:800 – в двух, 1:1600 – в четырех образцах.

Полученные результаты можно объяснить тем, что антитела к холерному токсину циркулируют в сыворотке крови человека более длительное время, чем антитела специфичные к O1 и O139 антигенам холерного вибриона. Так, в опытах на добровольцах установлено, что антитоксические антитела обнаруживаются в сыворотке крови человека не менее 25 месяцев (срок наблюдения) после инфицирования [5].

Проведенная работа позволила оценить уровень формирования иммунной прослойки к возбудителю холеры. Полученные результаты продемонстрировали высокий уровень антител, комплементарных к холерному токсину в сыворотках крови людей, проживающих в провинциях Гвинейской Республики. Обнаружение антител класса IgG к холерному токсину может свидетельствовать как о контакте населения с возбудителем холеры, так и о формировании поствакцинального иммунитета.

Результаты выявления антител класса IgG к холерному токсину в сыворотках крови людей, проживающих в разных провинциях Гвинейской Республики

Detection of IgG antibodies to cholera toxin in blood sera of people living in different provinces of the Republic of Guinea

Провинция Province	Кол-во исследованных образцов The number of studies samples	Кол-во образцов с выявленными антителами к ХТ The number of samples with identified antibodies to CT	Доля серопозитивных проб, % (доверительный интервал) The share of seropositive samples, % (confidence interval)
Mamou	120	42	35,0 (27,0–43,9)
Kindia	55	16	29,1 (18,8–42,1)
Faranah	15	8	53,3 (30,1–75,2)
Итого / Total:	190	66	34,7 (28,3–41,8)

Полученные результаты говорят о необходимости предварительного определения фонового уровня противохолерных антител в сыворотке крови людей перед началом вакцинации и ревакцинации для достоверной оценки формирования поствакцинального иммунитета.

Данная работа проведена в соответствии с Распоряжением Правительства РФ от 25 июля 2015 г. № 1448-р «О российско-гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике». Исследование выполнялось в рамках НИР 61-1-16 «Изучение этиологической структуры и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей холеры и диарейных заболеваний» (2015–2017 гг.).

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В., Куриленко М.П., Пичурина Н.Л., Водопьянов А.С., Левченко Д.А., Иванова С.М., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Прогноз по холере на 2019 г. на основании анализа эпидемиологической обстановки в мире, СНГ и России в 2009–2018 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 1:64–73. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-64-73.
2. World Health Organization. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2018, 93(38):489–500. [Электронный ресурс]. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274654/WER9338.pdf?ua=1> (дата обращения 15.07.2019).
3. Grout L., Martinez-Pino I., Ciglenecki I., Keita S., Diallo A.A., Traore B., Delamou D., Toure O., Nicholas S., Rusch B., Staderini N., Serafini M., Grais R.F., Luquero F.J. Pregnancy Outcomes after a Mass Vaccination Campaign with an Oral Cholera Vaccine in Guinea: A Retrospective Cohort Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(12):e0004274. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004274.
4. Гришин Е.В., Валякина Т.И. Получение моноклональных антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli* для разработки биплексного анализа токсинов в объектах окружающей среды. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(4):19–32. DOI: 10.15407/biotech6.04.019.
5. Levine M.M., Young C.R., Hughes T.P., O'Donnel S., Black R.E., Clements M.L., Robins-Browne R., Lim Y.-L. Duration of serum antitoxin response following *Vibrio cholerae* infection in North Americans: relevance for seroepidemiology. *Am. J. Epidemiol.* 1981; 114(3):348–54. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a113201.
6. Методические указания. МУК 4.2.2315-08 «Серологические методы в диагностике холеры». Дополнение к МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 18 января 2008 года.
7. Онищенко Г.Г., Брагина И.В., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Шеенков Н.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Ганин В.С., Миронова Л.В., Загоскина Т.Ю., Носкова О.А., Куликалова Е.С., Басов Е.А., Токарева Л.Е., Тайкова Т.С., Долгова Т.М. Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике холеры. Иркутск; 2012. 92 с.
8. Кэтти Д., редактор. Антитела. Методы. М.: Мир; 1991. Т. 1. 287 с.
9. Yuan J., Wang E., Fox B. A Immune Monitoring Technology Primer: protein microarray («seromics»). *J. Immunother. Cancer*. 2016; 4:2. DOI: 10.1186/s40425-016-0106-4.
10. Уткин Д.В., Осина Н.А., Киреев М.Н., Спицын А.Н., Щербаков А.С. Биологический микрочип для выявления и многопараметрического анализа противохолерных антител. Патент РФ № 2528099, опубл. 10.09.2014 г. Бюл. № 25.
11. Уткин Д.В., Осина Н.А., Спицын А.Н., Киреев М.Н., Громова О.В., Захарова Т.Л., Найденова Е.В., Куклев В.Е. Разработка биочипа для выявления противохолерных антител в сыворотке крови человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(2):50–3.
12. Rebaudet S., Mengel M.A., Koivogui L., Moore S., Mutreja A., Kande Y., Yattara O., Keita V.S., Njanpop-Lafourcade B.-M., Fournier P.-E., Garnotel E., Keita S., Piarroux R. Deciphering the Origin of the 2012 Cholera Epidemic in Guinea by Integrating Epidemiological and Molecular Analyses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(6):e2898. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002898.
13. World Health Organization. Cholera. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2014; 89(31):345–56. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int/wer/2014/wer8931.pdf?ua=1> (дата обращения 15.07.2019).
14. Martinez-Pino I., Luquero F.J., Sakoba K., Sylla S., Haile M., Grais R.F., Ciglenecki I., Quilici M.-L., Page A.-L. Use of a Cholera Rapid Diagnostic Test during a Mass Vaccination Campaign in Response to an Epidemic in Guinea, 2012. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(8):e2366. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002366.
15. Гржибовский А.М. Доверительные интервалы для частот и долей. *Экология человека*. 2008; 5:57–60.

References

1. Moskvitina E.A., Yanovich E.G., Kругликов V.D., Titova S.V., Kurilenko M.L., Pichurina N.L., Vodop'yanov A.S., Levchenko D.A., Ivanova S.M., Vodop'yanov S.O., Oleynikov I.P. [Cholera Forecast for the Year 2019 Based on Assessment of Epidemiological Situation Around the World, Across CIS and Russia in 2009-2018]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 1:64–73. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-64-73.
2. World Health Organization. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2018, 93(38):489–500. (Cited 15 July 2019). [Internet]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274654/WER9338.pdf?ua=1>.
3. Grout L., Martinez-Pino I., Ciglenecki I., Keita S., Diallo A.A., Traore B., Delamou D., Toure O., Nicholas S., Rusch B., Staderini N., Serafini M., Grais R.F., Luquero F.J. Pregnancy Outcomes after a Mass Vaccination Campaign with an Oral Cholera Vaccine in Guinea: A Retrospective Cohort Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(12):e0004274. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004274.
4. Grishin E.V., Valyakina T.I. [Obtaining of monoclonal antibodies against cholera toxin and heat labile enterotoxin of *E. coli* for development of the toxins duplex analysis in environmental specimens]. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(4):19–32. DOI: 10.15407/biotech6.04.019.
5. Levine M.M., Young C.R., Hughes T.P., O'Donnel S., Black R.E., Clements M.L., Robins-Browne R., Lim Y.-L. Duration of serum antitoxin response following *Vibrio cholerae* infection in North Americans: relevance for seroepidemiology. *Am. J. Epidemiol.* 1981; 114(3):348–54. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a113201.
6. Methodological Regulations. MR 4.2.2315-08 «Serological methods in cholera diagnosis». Supplement to MR 4.2.2218-07 «Laboratory diagnostics of cholera». Approved by the Head of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human welfare, Chief State Sanitary Officer of the Russian Federation, G.G. Onishchenko on January 18, 2008.
7. Onishchenko G.G., Bragina I.V., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Sheenkov N.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Ganin V.S., Mironova L.V., Zagorskina T.Yu., Noskova O.A., Kulikalova E.S., Basov E.A., Tokareva L.E., Taikova T.S., Dolgova T.M. [Guidelines for practice classes on laboratory diagnosis of cholera]. Irkutsk; 2012. 92 p.
8. Katty D., editor. [Antibodies. Methods]. M.: «Mir»; 1991. Vol. 1. 287 p.
9. Yuan J., Wang E., Fox B. A Immune Monitoring Technology Primer: protein microarray («seromics»). *J. Immunother. Cancer*. 2016; 4:2. DOI: 10.1186/s40425-016-0106-4.
10. Utkin D.V., Osina N.A., Kireev M.N., Spitsyn A.N., Shcherbakova S.A. [Biological microchip for the detection and multi-parameter analysis of anti-cholera antibodies]. RF Patent No 2528099, publ. September 10, 2014. Bulletin No. 25.
11. Utkin D.V., Osina N.A., Spitsyn A.N., Kireev M.N., Gromova O.V., Zakharova T.L., Naidenova E.V., Kuklev V.E. [The development of biochip to detect anti-cholera antibodies in human blood serum]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2015; 60(2):50–3.
12. Rebaudet S., Mengel M.A., Koivogui L., Moore S., Mutreja A., Kande Y., Yattara O., Keita V.S., Njanpop-Lafourcade B.-M., Fournier P.-E., Garnotel E., Keita S., Piarroux R. Deciphering the Origin of the 2012 Cholera Epidemic in Guinea by Integrating Epidemiological and Molecular Analyses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(6):e2898. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002898.
13. World Health Organization. Cholera. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2014; 89(31):345–56. (Cited 15 July 2019). [Internet]. Available from: <http://www.who.int/wer/2014/wer8931.pdf?ua=1>.
14. Martinez-Pino I., Luquero F.J., Sakoba K., Sylla S., Haile M., Grais R.F., Ciglenecki I., Quilici M.-L., Page A.-L. Use of a Cholera Rapid Diagnostic Test during a Mass Vaccination Campaign in Response to an Epidemic in Guinea, 2012. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(8):e2366. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002366.

15. Grzhibovsky A.M. [Confidence intervals for proportions]. *Ekologiya Cheloveka [Human Ecology]*. 2008; 5:57–60.

Authors:

Utkin D.V., Naidenova E.V., Nikiforov K.A., Boiko A.V., Agafonov D.A., Lyapin M.N. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Lopatin A.A. Plague Control Center. 4, Musorgskogo St., Moscow, 127490, Russian Federation. E-mail: protivochym@nlm.ru.

Bangoura I., Camara T.D., Boumbaly S., Boiro M.Y. Research Institute of Applied Biology of Guinea. Kindia, Republic of Guinea.

Об авторах:

Уткин Д.В., Найденова Е.В., Никифоров К.А., Бойко А.В., Агафонов Д.А., Ляпин М.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Лопатин А.А. Противочумный центр. Российская Федерация, 127490, Москва, ул. Мусоргского, 4. E-mail: protivochym@nlm.ru.

Bangoura I., Camara T.D., Boumbaly S., Boiro M.Y. Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи. Киндия, Гвинейская Республика.

Поступила 01.08.19.

Отправлена на доработку 26.08.19.

Принята к публ. 02.09.19