

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-67-72

УДК 616.932:616-07

Л.В. Ларионова, Д.И. Симакова, А.Н. Наркевич, И.В. Архангельская, Г.Г. Шубин

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ДИАГНОСТИКУМА ПОЛИМЕРНОГО ХОЛЕРНОГО АНТИГЕННОГО НА ОСНОВЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *VIBRIO CHOLERA* O1 СЕРОГРУППЫ**

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Представители рода *Vibrio cholerae* отличаются структурой липополисахарида, в частности его О-полисахаридных цепей (О-антиген), определяющей серологическую специфичность вибрионов. В настоящее время для получения препарата липополисахарида используется водно-фенольный метод. Однако данная методика относится к жестким химическим методам, приводит к изменению исходной молекулярной организации биополимера, нарушая его структуру и биологические свойства. Современные технологии при разработке диагностических препаратов для иммуносуппензионной реакции агломерации объемной позволяют получать синтетические носители с различными реакционными группами на поверхности частиц, способными связывать антигены/антитела. **Цель** исследования – создание холерного антигенного диагностикума на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы. **Материалы и методы.** В качестве сенситина использован липополисахарид, полученный с помощью авторской модификации метода ферментативной очистки из клеточных оболочек холерного вибриона с использованием ультразвуковой дезинтеграции. **Результаты и обсуждение.** Полученный сенситин содержит небольшие примеси белка (1,5 %) и нуклеиновых кислот (0,1 %). Диагностический препарат характеризуется высокой аналитической чувствительностью в реакции агломерации объемной с холерными коммерческими и экспериментальными кроличьими сыворотками к *Vibrio cholerae* O1 серогруппы (1:640 – 1:5120) и аналитической специфичностью (диагностикум не взаимодействует с гетерологичными сыворотками, с сыворотками к возбудителям острых кишечных инфекций, а также с сыворотками здоровых доноров). Сконструирован диагностикум полимерный холерный антигенный, предназначенный для выявления антител к холерному липополисахарида в сыворотках крови больных, переболевших, подозрительных на заболевание или вакцинированных людей.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, липополисахарид, полимерные микросферы, диагностикум, аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность.

Корреспондирующий автор: Ларионова Людмила Владимировна, e-mail: plague@aanet.ru.

Для цитирования: Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Наркевич А.Н., Архангельская И.В., Шубин Г.Г. Конструирование диагностикума полимерного холерного антигенного на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:67–72. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-67-72

L.V. Larionova, D.I. Simakova, A.N. Narkevich, I.V. Arkhangel'skaya, G.G. Shubin

**Construction of Polymeric Antigenic Diagnosticum Based on *Vibrio cholerae* O1 Lipopolysaccharide**

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Abstract.** Representatives of the genus *Vibrio cholerae* differ in the structure of lipopolysaccharide, in particular, its O-polysaccharide chains (O-antigen), which determines the serological specificity of vibrios. Currently, the water-phenolic method is used to obtain the lipopolysaccharide preparation. However, this technique relates to harsh chemical methods, leads to a change in original molecular organization of biopolymer, violating its structure and biological properties. Modern technologies in the development of diagnostic kits for the immuno-suspension reaction of volume agglomeration allow for obtaining synthetic carriers with different reaction groups on the particle surface capable to bind antigens/antibodies. **The aim** of this study was to construct cholera antigenic polymeric diagnostic kit based on the lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 serogroup. **Materials and methods.** The lipopolysaccharide was used as a sensitizer obtained through the author's modification of enzymatic purification from the cell membranes of *Vibrio cholerae* using ultrasonic disintegration. **Results and discussion.** The resulting sensitin contains small impurities of protein (1.5 %) and nucleic acids (0.1 %). Diagnosticum is characterized by high analytical sensitivity in agglomeration reaction with commercial and experimental rabbit serum to *Vibrio cholerae* O1 serogroup (1:640 – 1:5120) and analytical specificity (the diagnosticum does not interact with heterologous sera, with sera to pathogens of acute intestinal infections, as well as with sera from healthy donors). A polymeric antigenic cholera diagnosticum designed to detect antibodies to lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* in the blood serum of patients who were ill, suspected of the disease or vaccinated people has been constructed.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, lipopolysaccharide, polymeric microspheres, diagnosticum, analytical sensitivity, analytical specificity.

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

Corresponding author: Lydmila V. Larionova, e-mail: plague@aanet.ru.

Citation: Larionova L.V., Simakova D.I., Narkevich A.N., Arkhangel'skaya I.V., Shubin G.G. Construction of Polymeric Antigenic Diagnosticum Based on *Vibrio cholerae* O1 Lipopolysaccharide. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:67–72. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-67-72

Received 22.07.19. Revised 24.10.19. Accepted 28.11.19.

Совершенствование лабораторной диагностики холеры, в том числе создание новых препаратов, которые позволяют выявлять противохолерные антитела в сыворотках крови больных, подозрительных на заболевание или вакцинированных людей, является одним из перспективных направлений исследования. Известно, что представители вида *Vibrio cholerae* отличаются структурой липополисахарида (ЛПС), а именно его О-полисахаридных цепей (О-антигена), определяющих серологическую специфичность вибрионов. ЛПС является крупным структурным компонентом клеточной оболочки грамотрицательных бактерий (в том числе и холерного вибриона), с его действием на организм связывают объективные клинические проявления интоксикации [1, 2]. В связи с этим актуально создание новых диагностических препаратов для выявления противохолерных антител к липополисахарида [3, 4].

При исследовании роли ЛПС в патогенезе различных заболеваний важным этапом является его выделение из бактериальной клетки возбудителя. В настоящее время разработаны и предложены различные методики выделения и очистки ЛПС, позволяющие определять его биологическую функцию, химическую структуру и серологическую активность. В литературе приводятся способы выделения ЛПС из бактериальных клеток сальмонелл и псевдомонад [5], а также чумного микроба [6, 7]. Наиболее широкое применение имеет водно-фенольный способ получения ЛПС [8, 9]. Использование фенола в различных вариантах относится к жестким химическим методам выделения эндотоксина и приводит к изменению исходной молекулярной организации биополимера, нарушая его структуру и биологические свойства. При этом необходимо отметить высокую токсичность и химическую агрессивность самого фенола, что является ограничивающим фактором при получении больших количеств ЛПС. Щадящие методы получения ЛПС основаны на предварительном разрушении или лизисе бактерий с последующей депротеинизацией лизата протеазами и нуклеазами.

Для выявления противохолерных антител в сыворотках больных, подозрительных на заболевание холерой, и вакцинированных людей ранее применялись эритроцитарные диагностикумы. Свойства биологических носителей зависят от генетических особенностей и возраста донора, сезона, условий содержания животного и т.д., что обуславливает нестандартность и нестабильность эритроцитарного носителя. На протяжении нескольких лет широко обсуждался вопрос о замене эритроцитарного носителя полимерными латексами. Все большее применение находят реакции с использованием диагностических препаратов на основе полимерных микросфер. Современные технологии позволяют получать синтетические носители различных размеров с реакционными группами на поверхности частиц, способных фиксировать антигены/антитела, что способствует получению стандартных и стабильных диагностических препаратов. Иммуносуппензионная реакция

агломерации объемная (РАО), проводимая при использовании латексных диагностикумов, является доступным и простым в техническом отношении методом, поскольку не требует наличия специального оборудования, является одностадийной реакцией и может быть применена в полевых условиях [10, 11, Приказ Роспотребнадзора № 1116 от 01.12.2017 г. «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней»].

**Цель работы** – конструирование диагностикума полимерного холерного антигенного на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы.

### Материалы и методы

Поликлональные кроличьи сыворотки к культурам *V. cholerae* Classical 1395, *V. cholerae* O139 16064, *V. cholerae* El Tor 2044, *V. cholerae* El Tor 13020 получали по двум схемам. Первая схема включала в себя пять инъекций суточной культуры *V. cholerae*, обеззараженной кипячением в течение 30 мин, с интервалами в 4 сут с увеличивающимися концентрациями (от  $25 \cdot 10^7$  м.к. до  $1 \cdot 10^9$  м.к.). Первая инъекция проводилась внутривенно, последующие – подкожно. Через 7 сут после последней инъекции проверяли титр анти-ЛПС антител и проводили тотальное обескровливание.

Вторая схема включала в себя предварительное подкожное введение «Тактивина» в течение 3 дней в количестве 0,3 мл, на 4 день внутривенно вводили  $25 \cdot 10^7$  м.к. суточной культуры *V. cholerae*, обеззараженной кипячением в течение 2 ч. С 9 по 11 сут подкожно вводили  $25 \cdot 10^7$  м.к. с неполным адьювантом; на 16, 17 и 18 сут –  $50 \cdot 10^7$  м.к. с неполным адьювантом; на 23, 24, 25 сут –  $75 \cdot 10^7$  м.к. с неполным адьювантом; на 30–32 сут –  $1 \cdot 10^9$  м.к. с неполным адьювантом. Через 7 сут после последней инъекции проверяли титр анти-ЛПС антител и проводили забор крови.

Все эксперименты с животными выполнялись в соответствии с законодательством Российской Федерации [Приказ Министерства здравоохранения РФ № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» от 01.04.2016 г., ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организация процедур», ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»] и Директивой европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [Директива 2010/63/EU]. Эксперименты осуществляли в соответствии с СП 1.3.3118-13. Для получения нормальных человеческих сывороток получено информированное согласие.

Для исследования чувствительности и специфичности полученного экспериментального диагностикума использовали коммерческие и экс-

периментальные противохолерные сыворотки. Аналитическую чувствительность оценивали с помощью коммерческих сывороток: сыворотка диагностическая холерная O1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации (РА), серия 83, 87 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», и экспериментальная кроличья противохолерная сыворотка к *V. cholerae* O1 (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт).

Аналитическую специфичность оценивали, используя коммерческие сыворотки: сыворотка диагностическая холерная неO1 группы O139 адсорбированная кроличья для реакции агглютинации (РА) на стекле, серия 86 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»); «Сыворотка сальмонеллезная адсорбированная О-поливалентная основных групп ABCDE для РА (ПЕТСАЛ®)», серия 04111 (ФГУП СПбНИИВС); «Сыворотка диагностическая шигеллезная адсорбированная поливалентная к *Shigella flexneri* I–VI для РА (АГНОЛЛА®)», серия 69-1113 (ФГУП СПбНИИВС); «Сыворотка диагностическая эшерихиозная ОКА поливалентная сухая для РА», серия 6010214 (ОАО «Биомед»), (ФБУН НИИМЭ им. Пастера); экспериментальные кроличьи сыворотки к *V. cholerae* O139 16064 и *V. cholerae* nonO1/nonO139-O2, *V. cholerae* nonO1/nonO139-O5, *V. cholerae* nonO1/nonO139-O22 (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт), сыворотки крови, полученные от здоровых доноров.

Липополисахарид выделяли по авторской модификации метода R.P. Darveau и R.T.W. Hancock (1983 г.) из клеточных оболочек холерного вибриона с последующей ферментативной очисткой от примесей белков и нуклеиновых кислот. В препарате ЛПС определяли белок по Лоури [12], нуклеиновые кислоты – по Спирину [13]. Электрофорез полученного препарата проводили по методике U.K. Laemmli в 15 % ПААГ-SDS геле [14]. Нагрузка препарата на лунку составляла 1,5 мкг. Для выявления ЛПС гели окрашивали серебром, используя коммерческий набор «Bio-Rad Silver Stain» в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Полиакролеиновый микросферический носитель получали путем синтеза монодисперсных полимерных микросфер с альдегидными группами в условиях одномоментно протекающей анионной и радикальной полимеризации акролеина в водно-щелочной среде. Окрашивание частиц сферической формы размером  $(1,2 \pm 0,1)$  мкм производили внесением красителя «Тианин» в полимеризационную смесь в процессе синтеза. После полимеризации носитель отмывали дистиллированной водой при температуре 100 °С. В ходе сенсibilизации сферического носителя холерным ЛПС 50 мг отмывали 0,1 М карбонатным буфером pH 9,2 и центрифугировали при 3000 g при комнатной температуре в течение 15 мин. Осадок сфер суспендировали в 8 мл карбонатного буфера pH  $(9,2 \pm 0,1)$  и нагревали до температуры 60 °С в течение 15 мин на водяной бане. Прогретый препарат ЛПС в 3ФР pH  $(7,2 \pm 0,1)$  вносили в суспензию носителя, инкубировали при

температуре 60 °С в течение 2 ч на электромагнитной мешалке, помещали в холодильник на 16–18 ч. После холодовой экспозиции к смеси добавляли 1 мл 1 % раствора желатозы; инкубировали в течение 2 ч на электромагнитной мешалке при комнатной температуре; отмывали трижды 3ФР pH  $(7,2 \pm 0,1)$ ; затем суспендировали в 4 мл 0,1 % раствора желатозы. В результате проведенных исследований получен диагностиком полимерный холерный антигенный на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы с рабочим разведением 1:7.

Для повышения стабильности свойств и увеличения срока хранения разработанного диагностического препарата подобраны оптимальные условия его лиофилизации.

Жидкий препарат центрифугировали, осадок полимерного диагностикума суспендировали в 3 % желатозо-сахарозной среде высушивания. Перед лиофилизацией проводили предварительное замораживание жидкого диагностического препарата охлаждением в жидком азоте при температуре -196 °С в течение 1–2 мин. Затем флаконы с экспериментальным препаратом выдерживали в низкотемпературном шкафу для глубокого замораживания при температуре -30 °С в течение 16 ч. Лيوфилизацию проводили в аппарате для лиофильного высушивания «POWER DRY PL 900» («Termascientific») при вакуумном подогреве в течение 15 ч. В процессе лиофилизации в камере высушивания автоматически поддерживалось давление 0,067 hPa. Препараты высушивали до конечной температуры в камере высушивания при 22 °С, после этого флаконы закрывали резиновыми пробками, завальцовывали в среде осушенного стерильного воздуха при нормальном атмосферном давлении и хранили в холодильнике при температуре 4 °С.

Перед постановкой РАО лиофилизированную нормальную кроличью сыворотку (НКС) растворяли в 5 мл 3ФР pH  $(7,2 \pm 0,1)$ , получая разведение 1:100. Лيوфилизированный диагностиком суспендировали в 3,5 мл 3ФР, получая разведение 1:7. Контрольную холерную сыворотку, лиофилизированную из разведения 1:10, растворяли в 1 мл 3ФР, получая разведение 1:10.

Для постановки РАО в каждую лунку 96-луночного планшета с «U»-образными лунками для иммунологических реакций вносили 50 мкл НКС в разведении 1:100. Затем в первую лунку каждого ряда вносили 50 мкл исследуемой сыворотки и двукратно титровали до конца ряда. Диагностикум в рабочем разведении вносили в объеме 25 мкл в каждую лунку и оставляли при комнатной температуре. Для контроля спонтанной агглютинации в две лунки вносили 50 мкл НКС и 25 мкл рабочего разведения диагностикума. Учет результатов осуществляли через 2–2,5 ч. За положительный результат принимали цветной голубой агломерат, выстилающий все дно лунки равномерно или агломерат, выстилающий дно лунки с четко очерченными краями. В отрицательных случаях и в контроле образовывалось компактное колечко или точка в центре лунки.



## Результаты и обсуждение

Таблица 1 / Table 1

## Определение титров антител в экспериментальных кроличьих сыворотках

## Determination of antibody titer in experimental rabbit sera

| Штамм, к которому получена сыворотка<br>The strain to which the serum is obtained | Титр в РАО<br>Схема 1<br>The titer in volume agglomeration reaction<br>Scheme 1 | Титр в РАО<br>Схема 2<br>The titer in volume agglomeration reaction<br>Scheme 2 |
|---|---|---|
| <i>V. cholerae</i> Classical 1395   | 1:640   | 1:640   |
| <i>V. cholerae</i> El Tor 13020   | 1:1280  | 1:2560  |
| <i>V. cholerae</i> El Tor 2044  | 1:640   | 1:640   |
| <i>V. cholerae</i> O139 16064   | 1:1280  | 1:2560  |

В ходе исследования получены поликлональные кроличьи сыворотки к культурам *V. cholerae* Classical 1395, *V. cholerae* O139 16064, *V. cholerae* El Tor 2044, *V. cholerae* El Tor 13020, обезвреженными двумя методами – кипячением в течение 30 мин и 2 ч для последующего исследования чувствительности диагностического препарата. Разный температурный режим обезвреживания бактериальных масс перед иммунизацией кроликов может влиять на увеличение титра анти-ЛПС антител, что позволяет выбрать контрольную сыворотку для определения чувствительности разработанного диагностического препарата. Результаты определения титров антител в экспериментальных сыворотках к *V. cholerae* Classical 1395, *V. cholerae* El Tor 13020, *V. cholerae* El Tor 2044, *V. cholerae* O139 16064, полученных по двум различным схемам, в объемной реакции агломерации с соответствующими культурами холерного вибриона отражены в табл. 1.

Результаты исследования сывороток в РАО показали, что время кипячения существенно не влияет на увеличение количества антител.

Лиофилизированный препарат ЛПС, полученный ферментативным методом из клеточных оболочек, представляет собой белые хлопья, при растворении в дистиллированной воде или 3ФР pH (7,2±0,1) образующие гомогенную, слегка опалесцирующую суспензию. При исследовании чистоты препарата показано присутствие небольших примесей белков и нуклеиновых кислот: 1,5 % белка по Лоури и 0,1 % нуклеиновых кислот. Электрофоретическое исследование показало, что препарат ЛПС представлен полосами с молекулярной массой 12–23 кДа.

Для конструирования диагностикума полимерного холерного антигенного на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы сенсибилизировали полимерные микросферы препаратом ЛПС в карбонатном буфере pH 9,2 в дозе 450 мкг на 50 мг сферического носителя.

При оценке рабочих характеристик разрабатываемого диагностического препарата оценивали аналитическую чувствительность и специфичность. Аналитическая чувствительность представляет собой то минимальное количество антигена, которое можно определить с помощью диагностикума. Аналитическая специфичность отражает способность диагностикума определять специфический антиген в образце [15].

Аналитическую чувствительность и специфичность разработанного диагностического препарата изучали в реакции агломерации объемной (табл. 2). Титры антител в экспериментальных кроличьих сыворотках определены с соответствующими культурами *V. cholerae* Classical 1395, *V. cholerae* El Tor 13020 в объемной реакции агглютинации, титры антител в коммерческих сыворотках диагностических холерных агглютинирующих были указаны в инструкциях по применению.

Результаты исследования аналитической чувствительности сконструированного диагностикума полимерного холерного антигенного на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы показали его высокую чувствительность. Титры антител коммерческих холерных лошадиных и экспериментальных кроличьих сывороток в РАО с представленным диагностикумом составили от 1:640 до 1:5120.

Таблица 2 / Table 2

## Результаты исследования аналитической чувствительности экспериментального диагностикума

## The results of the study of the analytical sensitivity of experimental diagnosticum

| Сыворотка<br>Serum  | Титр в РА<br>Titer in agglutination<br>reaction | Титр в РАО<br>Titer in volume<br>agglomeration reaction |
|---|---|---|
| Коммерческая сыворотка диагностическая холерная O1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации (РА) (серия 83)<br>Commercial diagnostic cholera O1 serum, adsorbed, dry, for agglutination reaction (AR) (series 83) | 1:800   | 1:1280  |
| Коммерческая сыворотка диагностическая холерная O1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации (РА) (серия 87)<br>Commercial diagnostic cholera O1 serum, adsorbed, dry, for agglutination reaction (AR) (series 87) | 1:2000  | 1:5120  |
| Кроличья экспериментальная сыворотка к <i>V. cholerae</i> O1 13020<br>Rabbit experimental serum to <i>V. cholerae</i> O1 13020  | 1:640   | 1:640   |
| Кроличья экспериментальная сыворотка к <i>V. cholerae</i> O1 Classical 1395<br>Rabbit experimental serum to <i>V. cholerae</i> O1 Classical 1395  | 1:640   | 1:640   |
| Нормальная кроличья сыворотка<br>Normal rabbit serum  | -   | Отрицательно<br>Negative                                |

Результаты исследования аналитической специфичности диагностикума в РАО представлены в табл. 3.

Показана высокая специфичность разработанного диагностикума. Диагностический препарат не давал положительные реакции в РАО как с коммерческими, так и с экспериментальными кроличьими гетерологичными холерными сыворотками, не реагировал с сыворотками здоровых доноров, а также с сыворотками, предназначенными для диагностики возбудителей острых кишечных инфекций. Установленный титр 1:20 в реакции с сывороткой коммерческой сальмонеллезной адсорбированной О-поливалентной основных групп ABCDE является не специфическим и не влияет на результаты исследований сывороток.

При создании диагностического препарата следующим этапом исследования является расчет диагностической чувствительности и специфичности, позволяющие определить диагностический титр диагностикума [16].

Таким образом, сконструирован диагностикум полимерный холерный антигенный на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы. Препарат липополисахарида выделяли по авторской модификации метода R.P. Darveau и R.E. Hancock (1983 г.) из клеточных оболочек холерного вибриона, используя

ферментативный метод очистки от примесей белков и нуклеиновых кислот. Выделение ЛПС из клеточных оболочек холерного вибриона позволило сократить количество протеиназы, РНКазы, ДНКазы. При исследовании чистоты полученного препарата показано присутствие небольших примесей (1,5 % белка и 0,1 % нуклеиновых кислот). Электрофоретический анализ показал, что препарат ЛПС представлен S-формой с молекулярной массой 12–23 кДа и использован в качестве сенситина. При использовании экспериментальных кроличьих и коммерческих холерных диагностических сывороток установлена аналитическая чувствительность сконструированного препарата в титрах от 1:640 до 1:5120. Специфичность изучали на панели гетерологичных сывороток, а также сывороток здоровых доноров.

Для определения диагностического титра диагностикума полимерного холерного антигенного на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы необходимо продолжение изучения его диагностических характеристик на панели парных сывороток, полученных от больных холерой людей с подтвержденным диагнозом.

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

Таблица 3 / Table 3

Результаты исследования специфичности экспериментального диагностикума  
The results of the study of the analytical specificity of experimental diagnosticum

| Сыворотки<br>Sera   | Титр в РА<br>Titer in agglutination<br>reaction | Титр в РАО<br>Titer in volume ag-<br>glomeration reaction |
|---|---|---|
| Коммерческая сыворотка диагностическая холерная не O1 группы O139 адсорбированная кроличья для реакции агглютинации (РА) на стекле (серия 86)<br>Commercial diagnostic cholera non-O1, O139 serum, adsorbed, rabbit, for agglutination reaction (AR) on the slide (series 86) | 1:800   | Отрицательно<br>Negative                                  |
| Кроличья экспериментальная к штамму <i>V. cholerae</i> O139 16064<br>Rabbit experimental serum to <i>V. cholerae</i> O139 strain 16064  | 1:2560  | Отрицательно<br>Negative                                  |
| Кроличья экспериментальная сыворотка к <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139–O2 серогруппы<br>Rabbit experimental serum to <i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139–O2 serogroup   | 1:640   | Отрицательно<br>Negative                                  |
| Кроличья экспериментальная сыворотка к <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139–O5 серогруппы<br>Rabbit experimental serum to <i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139–O5 serogroup   | 1:1280  | Отрицательно<br>Negative                                  |
| Кроличья экспериментальная сыворотка к <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139–O22 серогруппы<br>Rabbit experimental serum to <i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139–O22 serogroup   | 1:640   | Отрицательно<br>Negative                                  |
| Сыворотка диагностическая шигеллезная адсорбированная поливалентная к <i>Shigella flexneri</i> I–VI (серия 69-1113)<br>Diagnostic Shigella serum, adsorbed, polyvalent to <i>Shigella flexneri</i> I–VI (series 69-1113)  | 1:640   | Отрицательно<br>Negative                                  |
| Сыворотка диагностическая эшерихиозная ОКА поливалентная (серия 623-0914)<br>Diagnostic Escherichia serum OKA, polyvalent (series 623-0914)   | 1:640   | Отрицательно<br>Negative                                  |
| Сыворотка сальмонеллезная адсорбированная О-поливалентная основных групп ABCDE (серия 23-0714)<br>Salmonella serum, adsorbed, O-polyvalent, of the main groups ABCDE (series 23-0714)   | 1:640   | 1:20  |
| Нормальная человеческая сыворотка № 1<br>Normal human serum No 1  | -   | Отрицательно<br>Negative                                  |
| Нормальная человеческая сыворотка № 2<br>Normal human serum No 2  | -   | Отрицательно<br>Negative                                  |
| Нормальная человеческая сыворотка № 3<br>Normal human serum No 3  | -   | Отрицательно<br>Negative                                  |
| Нормальная человеческая сыворотка № 4<br>Normal human serum No 4  | -   | Отрицательно<br>Negative                                  |
| Нормальная человеческая сыворотка № 5<br>Normal human serum No 5  | -   | Отрицательно<br>Negative                                  |

## Список литературы

1. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62(4):1301–14. PMID: 9841673. PMCID: PMC98947.
2. Гюлазян Н.М., Белая О.Ф., Малов В.А., Пак С.Г., Волчакова Е.В. Липополисахариды/эндотоксины грамотрицательных бактерий: роль в развитии интоксикации. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19(2):11–6.
3. Leung D.T., Uddin T., Xu P., Aktar A., Johnson R.A., Rahman M.A., Alam M.M., Bufalo M.K., Eckhoff G., Wu-Freeman Y., Yu Y., Sultana T., Khanam F., Saha A., Chowdhury F., Khan A.I., Charles R.C., LaRocque R.C., Harris J.B., Calderwood S.B., Cováč P., Qadri F., Ryan E.T. Immune responses to the O-specific polysaccharide antigen in children who received a killed oral cholera vaccine compared to responses following natural cholera infection in Bangladesh. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(6):780–8. DOI: 10.1128/CVI.00035-13.
4. Uddin T., Aktar A., Xu P., Johnson R.A., Rahman M.A., Leung D.T., Afrin S., Aktar A., Alam M.M., Rahman A., Chowdhury F., Khan A.I., Bhuiyan T.R., Bufano M.K., Rashu R., Yu Y., Wu-Freeman Y., Harris J.B., LaRocque R.C., Charles R.C., Cováč P., Calderwood S.B., Ryan E.T., Qadri F. Immune responses to O-specific polysaccharide and lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa in adult Bangladeshi recipients of an oral killed vaccine and comparison to responses in patients with cholera. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 90(5):873–81. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0498.
5. Darveau R.P., Hancock R.E. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J. Bacteriol.* 1983; 155(2):831–8. PMID: 6409884. PMCID: PMC217756.
6. Полунина Т.А., Гусева Н.П., Кузьмиченко И.А., Девдариани З.Л., Заднова С.П., Степанов А.В., Киреев М.Н. Способ получения липополисахарида возбудителя чумы. Патент РФ № 2483112, опублик. 27.05.2013 г.
7. Марков Е.Ю., Николаев В.Б. Способ получения бактериальных липополисахаридов. Патент РФ № 2051969, опублик. 10.01.1996 г. Бюлл. № 1.
8. Westphal V.O., Lüderitz O., Bister F. Über die Extraktion von Bacterien mit Phenol/Wasser. *Zeitschrift für Naturforschung B.* 1952; 7(3):148–55. DOI: 10.1515/znB-1952-0303.
9. Galanos C., Lüderitz O., Westphal O. A New method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 1969; 9(2):245–9. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.
10. Ломов Ю.М., Терентьев А.Н., Карбышев Г.Л. Перспективы создания препаратов для индикации возбудителей ООИ и других актуальных инфекций. В кн.: Материалы IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. М.: ООО «Санэпидмедиа»; 2007; С. 60–1.
11. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.
13. Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах. ОФС. 1.7.2.0018.15 (общая фармакопейная статья). [Электронный ресурс]. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0018-15-opredelenie-nukleinykh-kislot-po-metodu-spirina-v-immunobiologicheskikh-lekarstvennykh-preparatah/ofs-1-7-2-0018-15-opredelenie-nukleinykh-kislot-po-metodu-spirina-v-immunobiologicheskikh-lekarstvennykh-preparatah/> (дата обращения 15.06.2019).
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0/.
15. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine.* 2019; pii: S0264-410X(19)31020-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.
16. Власов В.В. Эпидемиология: учебное пособие для вузов. М.: ГЭОТАР-МЕД; 2006. 462 с.
17. Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]. 2014; 19(2):11–6.
18. Leung D.T., Uddin T., Xu P., Aktar A., Johnson R.A., Rahman M.A., Alam M.M., Bufalo M.K., Eckhoff G., Wu-Freeman Y., Yu Y., Sultana T., Khanam F., Saha A., Chowdhury F., Khan A.I., Charles R.C., LaRocque R.C., Harris J.B., Calderwood S.B., Cováč P., Qadri F., Ryan E.T. Immune responses to the O-specific polysaccharide antigen in children who received a killed oral cholera vaccine compared to responses following natural cholera infection in Bangladesh. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(6):780–8. DOI: 10.1128/CVI.00035-13.
19. Uddin T., Aktar A., Xu P., Johnson R.A., Rahman M.A., Leung D.T., Afrin S., Aktar A., Alam M.M., Rahman A., Chowdhury F., Khan A.I., Bhuiyan T.R., Bufano M.K., Rashu R., Yu Y., Wu-Freeman Y., Harris J.B., LaRocque R.C., Charles R.C., Cováč P., Calderwood S.B., Ryan E.T., Qadri F. Immune responses to O-specific polysaccharide and lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa in adult Bangladeshi recipients of an oral killed vaccine and comparison to responses in patients with cholera. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 90(5):873–81. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0498.
20. Darveau R.P., Hancock R.E. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J. Bacteriol.* 1983; 155(2):831–8. PMID: 6409884. PMCID: PMC217756.
21. Polunina T.A., Guseva N.P., Kuz'michenko I.A., Devdariani Z.L., Zаднова S.P., Степанов A.V., Киреев M.N. [Method for the production of lipopolysaccharide of plague agent]. RF Patent No 2483112, published on May 27, 2013.
22. Markov E.Yu., Nikolaev V.B. [Method for the production of bacterial lipopolysaccharides]. RF Patent No 2051969, published on January 10, 1996. Bulletin No 1.
23. Westphal V.O., Lüderitz O., Bister F. Über die Extraktion von Bacterien mit Phenol/Wasser. *Zeitschrift für Naturforschung B.* 1952; 7(3):148–55. DOI: 10.1515/znB-1952-0303.
24. Galanos C., Lüderitz O., Westphal O. A New method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 1969; 9(2):245–9. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.
25. Ломов Ю.М., Терентьев А.Н., Карбышев Г.Л. [Prospects of creation of preparations for indication of particularly dangerous infectious agents and other relevant infections]. In: [Proceedings of the IX Assembly of the All-Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists, and Parasitologists]. Moscow: "Sanepidemiya" LLC; 2007. P. 60–1.
26. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous infectious Diseases. Practice Guidelines]. 2nd edition, revised and updated. Moscow: CJSC "Shiko"; 2013. 560 p.
27. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.
28. [Determination of nucleic acids in immunobiological drugs, using Spirin's methodology. General Monograph 1.7.2.0018.15]. (Cited 15 June 2019). [Internet]. Available from: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0018-15-opredelenie-nukleinykh-kislot-po-metodu-spirina-v-immunobiologicheskikh-lekarstvennykh-preparatah/ofs-1-7-2-0018-15-opredelenie-nukleinykh-kislot-po-metodu-spirina-v-immunobiologicheskikh-lekarstvennykh-preparatah/>
29. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0/.
30. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine.* 2019; pii: S0264-410X(19)31020-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.
31. Vlasov V.V. [Epidemiology: Learning Guide for Higher Educational Institutions]. Moscow: "GEOTAR-MED"; 2006. 462 p.

## Authors:

Larionova L.V., Simakova D.I., Narkevich A.N., Arkhangel'skaya I.V., Shubin G.G. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

## Об авторах:

Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Наркевич А.Н., Архангельская И.В., Шубин Г.Г. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 22.07.19.

Отправлена на доработку 24.10.19.

Принята к публ. 28.11.19.