

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-88-95

УДК 616.932:612.017.1

В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, О.А. Якушева, Д.А. Левченко, М.В. Ренгач

Получение и характеристика иммунных асцитических жидкостей к штаммам *Vibrio cholerae* R-варианта

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

Цель работы – получить иммунные асцитические жидкости (ИАЖ) мышей к целым клеткам холерных вибрионов R-варианта и оценить возможность их применения для обнаружения и характеристики атипичных холерных вибрионов. **Материалы и методы.** Проводили цикл иммунизации нелинейных белых мышей, включающий четыре инъекции антигена с адъювантом и без него, индукцию накопления асцитической жидкости путем внутрибрюшинной инокуляции мышинных миеломных клеток. Экспериментальные ИАЖ изучали в серологических и иммунологических реакциях на наборе штаммов *Vibrio cholerae* R-варианта, *V. cholerae* nonO1/nonO139, *V. cholerae* O1 и гетерологичных микроорганизмах. **Результаты и обсуждение.** Полученные ИАЖ отличаются высокими титрами антител в непрямом иммуноферментном анализе (до 1:640000), а в реакции слайд-агглютинации агглютинируют атипичные холерные вибрионы в разведении от 1:8 до 1:32. Обнаружены перекрестные реакции в трех изучаемых группах штаммов *V. cholerae*, что свидетельствует о наличии у них сходных антигенов. По результатам электрофоретического разделения и иммуноблоттинга лизатов клеток штаммов установлено наличие общих мажорных белков в области 55–60 и 25 кДа. Наглядные отличия наблюдаются по нескольким минорным белкам в области 30–55 кДа, в частности они отсутствуют у типичных штаммов. Показано также, что экспериментальные ИАЖ содержат антитела к эпитопам коровой части липополисахарида и поверхностных белков, причем большая часть из них являются общими для исследуемых групп холерных вибрионов. Полученные данные позволяют заключить, что возможность обнаружения *V. cholerae* R-варианта повышается при условии использования набора ИАЖ к R-вибрионам; для серологического анализа атипичных штаммов ИФА предпочтительнее реакции слайд-агглютинации. Объединение ИАЖ в виде одного препарата представляется перспективным, так как позволяет охарактеризовать спектр поверхностных антигенных детерминант измененных штаммов и расширить возможности их обнаружения.

Ключевые слова: холерный вибрион, атипичный штамм, R-вариант, мышинная асцитическая жидкость, поликлональная сыворотка, агглютинация, антигенная детерминанта.

Корреспондирующий автор: Евдокимова Вероника Вячеславовна, e-mail: evdokimova_vv@antiplague.ru.

Для цитирования: Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Якушева О.А., Левченко Д.А., Ренгач М.В. Получение и характеристика иммунных асцитических жидкостей к штаммам *Vibrio cholerae* R-варианта. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; 3:88–95. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-88-95
Поступила 29.01.2024. Отправлена на доработку 13.03.2024. Принята к публ. 18.03.2024.

V.V. Evdokimova, L.P. Alekseeva, O.A. Yakusheva, D.A. Levchenko, M.V. Rengach

Production and Characterization of Immune Ascitic Fluids to *Vibrio cholerae* R-Variant Strains

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

Abstract. The aim of the work was to obtain immune ascitic fluids (IAF) of mice to whole cells of R-variant cholera vibrios and to evaluate the possibility of their use for detection and characterization of atypical cholera vibrios. **Materials and methods.** A cycle of immunization of nonlinear white mice was performed. It included four injections of antigen with and without adjuvant, induction of ascitic fluid accumulation through intraperitoneal inoculation of murine myeloma cells. Experimental IAFs were studied in serologic and immunologic reactions on a set of strains of R-variant *Vibrio cholerae*, *V. cholerae* nonO1/nonO139, *V. cholerae* O1 and heterologous microorganisms. **Results and discussion.** The obtained IAFs are notable for high antibody titers in indirect enzyme immunoassay (up to 1:640000), and agglutinate atypical cholera vibrios at dilutions from 1:8 to 1:32 in slide-agglutination reaction. Cross-reactions were found in the three groups of *V. cholerae* strains studied, indicating the presence of similar antigens. Based on the results of electrophoretic separation and immunoblotting of cell lysates of the strains, the presence of common major proteins in the region of 55–60 and 25 kDa was established. Evident differences were observed for several minor proteins in the 30–55 kDa region, in particular, they were absent in the typical strains. It is also shown that experimental IAFs contain antibodies to epitopes of the core part of LPS and surface proteins, most of them being common to the studied groups of cholera vibrios. The obtained data allow us to draw the following conclusions: the possibility of detecting a larger number of *V. cholerae* R-variants is increased if the ELISA kit to R-vibrios is used; the use of ELISA method is preferable to the slide-agglutination reaction for serologic analysis of atypical strains. Combining IAFs in the form of a single preparation seems promising, as it allows for characterizing the spectrum of surface antigenic determinants of altered strains and expanding the possibilities of their detection.

Key words: cholera vibrio, atypical strain, R-variant, murine ascitic fluid, polyclonal serum, agglutination, antigenic determinant.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Bioethics: All experiments with animals were carried out in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of the European Union for the Protection of Animals Used for Scientific Purposes (minutes of the meeting of the Bioethics Commission dated April 20, 2022 No. 5).

Corresponding author: Veronika V. Evdokimova, e-mail: evdokimova_vv@antiplague.ru.

Citation: Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Yakusheva O.A., Levchenko D.A., Rengach M.V. Production and Characterization of Immune Ascitic Fluids to *Vibrio cholerae* R-Variant Strains. *Problemny Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2024; 3:88–95. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-88-95

Received 29.01.2024. **Revised** 13.03.2024. **Accepted** 18.03.2024.

Evdokimova V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>

Alekseeva L.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9866-3579>

Yakusheva O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8159-7547>

Levchenko D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4676-0377>

Rengach M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7598-0013>

Атипичные штаммы холерных вибрионов с измененной антигенной структурой клеточной стенки нередко выделяются на территории Российской Федерации в ходе проведения мониторинговых исследований на холеру объектов окружающей среды (ООС). Штаммы отличаются низкой агглютинабельностью в отношении диагностических О-сывороток или агглютинируются только RO-сывороткой [1–5]. Среди холерных вибрионов RO установлено наличие двух вариантов штаммов: R и SR [6]. Согласно МУК 4.2.3745-22, измененные штаммы холерных вибрионов, которые агглютинируются всеми диагностическими холерными сыворотками, в том числе и RO, обозначают как SR-варианты. Штаммы *Vibrio cholerae*, агглютинирующиеся только диагностической холерной сывороткой RO, отнесены к R-варианту. Серологические особенности изолятов холерных вибрионов R-варианта связаны со строением О-липолисахарида [7]. Основу внешней антигенной мозаики R-вариантов составляет R-ЛПС, и все воздействия, которым подвергается микробная клетка, в первую очередь отражаются на структуре R-core, обуславливая его значительные вариации по терминальным моносахаридам. Иммунофлюоресцентный анализ (ИФА) с помощью панели моноклональных антител (МКА) поверхностных структур атипичных по агглютинабельности штаммов *V. cholerae* R-варианта показал, что среди исследуемых штаммов, идентифицированных при выделении как *V. cholerae* R-варианта, регистрируются отдельные культуры с различным содержанием О-антигена [8]. В связи с этим целесообразно получение поли- и моноклональных антител, направленных к поверхностным антигенам атипичных холерных вибрионов, выявление и изучение в серологических реакциях иммунодоминантных эпитопов мембранных белков, R-core, R-ЛПС штаммов *V. cholerae* R-варианта.

При создании гибридом-продуцентов МКА донорами иммунных спленоцитов служат белые мыши линии BALB/c. Поскольку репертуар иммунного ответа животных любой инбредной линии генетически рестриктирован [9], а в качестве партнера для слияния используются миеломные клетки этой же линии мышей, иммунный ответ формируется преимущественно против иммунодоминантных эпитопов. Получение поликлональных антител позволяет оценить весь спектр антигенных детерминант, участвующих в иммунном ответе. Они могут быть полу-

чены путем иммунизации лабораторных животных с последующим забором различных биологических жидкостей и выделением из них иммуноглобулинов. Чаще всего источником антител служат кровь или асцитические жидкости. Иммунная асцитическая жидкость (ИАЖ) тождественна по своему составу и специфической активности соответствующим иммунным сывороткам крови. Для получения ИАЖ иммунизированным животным в полость брюшины вводят асцитобразующий материал: адьювант и клетки злокачественной опухоли [10, 11]. Наиболее распространено использование ИАЖ мышей, так как от одной мыши за 3–4 забора можно получить до 20 мл ИАЖ. В качестве биопродуцентов используют как сингенных линейных мышей BALB/c, так и беспородных белых мышей [12]. Корректно подобранный цикл иммунизации позволяет получать высокотитражные ИАЖ, которые в дальнейшем могут быть использованы для выделения иммуноглобулинов и изучения с их помощью холерных вибрионов *V. cholerae* R-варианта.

Цель работы состояла в получении иммунных асцитических жидкостей мышей к целым клеткам холерных вибрионов R-варианта и оценке возможности их применения для обнаружения и характеристики атипичных холерных вибрионов.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали 63 штамма *V. cholerae* различной токсигенности и серологических групп (R-вариант, O1, nonO1/nonO139), изолированных из ООС на территории бывших республик СССР и административных территорий России. Для иммунизации животных использовали три штамма *V. cholerae* R-варианта: № 16290 (1995 г., Забайкальский край), № 18298 (2000 г., Приморский край), № 18138 (1999 г., Ленинградская область). Для контроля в исследование взяты тест-штаммы согласно МУ 3.3.2.2124-06: два токсигенных тест-штамма *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor № 12214 (*wbe⁺hly⁺ctxA⁺tcpA⁺*), *V. cholerae* O1 Ogawa classical № 1391 (*wbe⁺hly⁺ctxA⁺tcpA⁺*), нетоксигенный штамм *V. cholerae* nonO1/nonO139 № P-9741 (*wbe⁺hly⁺ctxA⁻tcpA⁻*). Кроме того, в качестве контроля использовали токсигенный штамм *V. cholerae* classical R-варианта № 16197/1 (*wbe⁺hly⁺ctxA⁺tcpA⁺*), изолированный от человека и несущий ген *wbeT*, но агглютинирую-

щийся только диагностической холерной сывороткой RO. Для оценки специфичности ИАЖ использовали гетерологичные микроорганизмы: *Escherichia coli* № MB 101, *E. coli* № 16804, *Shigella flexneri* № 1018516, *Sh. sonnei* № 10391, *Salmonella enteritidis* № 19493, *S. München* № 5177–5188; готовили взвеси 10^9 м.кл./мл и обеззараживали. Все штаммы получены из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Все этапы работы с живыми культурами микроорганизмов проводили с учетом требований СанПин 3.3686-21.

Реакция агглютинации. Согласно паспортным данным, используемые в работе изоляты холерных вибрионов при первичном выделении из ООС были идентифицированы как *V. cholerae* R-варианта по признаку агглютинации только сывороткой RO в диагностическом титре. Все штаммы с момента поступления и идентификации хранились в лиофильно высушенном состоянии. В нашей работе культуры вновь проверяли в развернутой реакции агглютинации (РА) с серогрупповой (O1), серовароспецифическими (Огава и Инаба) и RO-диагностическими холерными сыворотками в соответствии с МУК 4.2.3745-22. По результатам агглютинации штаммы *V. cholerae* условно объединены в три группы: 1) 20 штаммов *V. cholerae* O1 – агглютинировались серогрупповой (O1) и серовароспецифическими (Огава или Инаба) диагностическими холерными сыворотками в диагностических титрах в различных сочетаниях и содержали ген *wbeT* (*ctxA⁺tcpA⁺wbeT⁺wbfR⁻*, *ctxA⁻tcpA⁺wbeT⁺wbfR⁻*, *ctxA⁻tcpA⁻wbeT⁺wbfR⁻*), 2) 7 штаммов *V. cholerae* R-варианта, агглютинирующихся только холерной сывороткой RO в диагностическом титре (1/800) и у которых отсутствовал ген *wbeT* (*ctxA⁻tcpA⁻wbeT⁻wbfR⁺*), 3) 36 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 – нетоксигенные штаммы холерных вибрионов (*ctxA⁻tcpA⁻wbeT⁻wbfR⁻*), которые не агглютинировались диагностическими сыворотками холерными, в том числе RO [13, 14]. Штаммы, используемые для иммунизации животных, относились ко второй группе *V. cholerae* R-варианта, при этом изолят № 18138 также агглютинировался холерной серовароспецифической сывороткой O76.

Определение специфической активности (титрование) иммунных асцитических жидкостей проводили в реакции слайд-агглютинации с живыми культурами *V. cholerae* R-варианта № 16290, 18298, 18138, которыми иммунизировали животных. Из исходной асцитической жидкости готовили последовательные двукратные разведения до титра 1:64. Учет в объемной РА и слайд-агглютинации проводили по 4-крестовой системе, за положительный результат в объемной РА принимали агглютинацию на 4+ и 3+, а в слайд-агглютинации – на 4+.

Культивирование миеломы *in vitro*. Для асцитобразования использовали мышинные миеломные линии P3-X63/Ag8.653 (РКККП, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия) и NS0/1 (клон

миеломы P3X63/Ag8), хранящиеся в криобанке ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. После размораживания клетки миеломы выращивали в пластиковых чашках Петри в среде DMEM (Gibco, Invitrogen, США) с 10 % сыворотки плода коровы, 2 мМ глутамин и 50 мкг/мл гентамицина в условиях CO₂-инкубатора (37 °C, 5 % CO₂, влажность не менее 70 %). Все манипуляции с клетками проводили в ламинарном боксе с принудительной подачей стерильного воздуха. Морфологию клеток оценивали под инвертированным микроскопом.

Культивирование миеломных клеток *in vivo*.

После тиражирования миеломы *in vitro* клетки центрифугировали и ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI. Для индукции асцитных опухолей животных заранее (за 7–14 дней) праймировали пристаном в дозе 0,5 мл/мышь, затем внутрибрюшинно вводили 5–10 млн клеток миеломы. Далее наблюдали за формированием асцитной опухоли, начиная с 10–12-го дня производили пункцию брюшной полости, отбирали образовавшуюся асцитическую жидкость, содержащую клетки миеломы. Клетки перевивали иммунным животным для индукции асцитобразования, а также чистым животным для дальнейших пассажей миеломы.

Лабораторные животные. В опыт брали самок нелинейных белых мышей массой 20–22 г. Все эксперименты с животными выполнялись в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [15] (протокол заседания комиссии по биоэтике от 20.04.2022 № 5).

Иммунизация и индукция иммунных асцитических жидкостей. Работа по получению ИАЖ состояла из двух этапов – иммунизации и введения миеломных клеток.

В качестве антигенного материала использовали убитую кипячением взвесь холерных вибрионов (*V. cholerae* R-варианта № 16290, 18298, 18138), проверенную на специфическую стерильность трехкратным высеvom. Цикл иммунизации состоял из четырех инъекций: три инъекции антигенного материала (10^8 м.кл.), смешанного с адьювантом Фрейнда, в равных объемах по 0,2 мл с интервалом в 14 дней (1, 15 и 30-й дни) вводили внутрибрюшинно. Заключительную инъекцию проводили через 14 дней (45-й день): антигенный материал (10^8 м.кл.) без добавления адьюванта вводили внутримышечно. Через 7 дней (53-й день) после завершения цикла иммунизации животным делали инъекцию пристана в дозе 0,5 мл/мышь, спустя 7–14 дней внутрибрюшинно вводили миелому в количестве 10^7 кл./мышь. Сбор ИАЖ проводили по мере ее накопления путем повторных пункций брюшной полости (с интервалом 3–5 дней). ИАЖ центрифугировали при 3–4 тыс. об/мин в течение 20 мин для освобождения от клеточных элементов (миеломных клеток, лейкоцитов, макрофагов, тучных клеток) и фибрина. Надосадочную (прозрачную) ИАЖ

использовали по назначению. Серологическую активность ИАЖ проверяли в реакции слайд-агглютинации, непрямом иммуноферментном анализе, иммуноблоттинге.

Непрямой иммуноферментный анализ проводили по общепринятой методике в полистироловых планшетах [16]. Инактивированными взвешями холерных вибрионов сенсibilizировали пластик в дозе 10^8 м.кл./лунка. В качестве антивидовых антител использовали антимышиный пероксидазный конъюгат (HRP-Goat-Anti-Mouse, Invitrogen, США). Реакцию проявляли субстратной смесью, содержащей хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (AppliChem, Германия). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Sunrise (Tecan, Австрия) с программным обеспечением Magellan при длине волны 450 нм (референс-волна 620 нм). Результаты считали положительными, если значение D_{450} исследуемого образца в два раза и более превосходило среднее значение D_{450} отрицательных контролей. Постановку ИФА осуществляли в трех повторностях.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Электрофорез бактериальных взвесей проводили по методу U.K. Laemmli [17] в пластинах 12,5 % полиакриламидного геля размером 70×100×1 мм в денатурирующих условиях. Для окрашивания белковых фракций на мембране использовали краситель Ponceau S (Reanal, Будапешт, Венгрия). Постановку иммуноблоттинга осуществляли по методу H. Towbin *et al.* [18].

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft Office 2003). При анализе и обобщении результатов планшетного ИФА использовали параметрические статистические методы: вычисляли среднюю арифметическую, среднее квадратичное отклонение.

Результаты и обсуждение

Для получения ИАЖ в качестве антигена использовали целые клетки штаммов *V. cholerae* R-варианта: № 16290, 18298, 18138. В результате иммунизации мышей и индукции образования ИАЖ получено по две серии ИАЖ к каждому штамму R-варианта *V. cholerae* в объеме 5–10 мл. Оценка специфической активности полученных ИАЖ в реакции слайд-агглютинации показала, что они агглютинировали холерные вибрионы *V. cholerae* R-варианта № 16290, 18298 и 18138 в пределах титров 1:8 – 1:32 (табл. 1).

При использовании в непрямом иммуноферментном анализе в качестве антигена (сенситина) убитых кипячением клеток холерных вибрионов *V. cholerae* R-варианта № 16290, 18298, 18138 установлены предельные титры ИАЖ от 1:160000 до 1:640000. Судя по показателям титров в РА и оптической плотности в ИФА, наибольшей серологической активностью отличается ИАЖ-2.

Затем иммунные асцитические жидкости оценили в ИФА на наличие перекрестных антител с гетерологичными микроорганизмами: *E. coli*, *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei*, *S. enteritidis*, *S. München*. Перекрестной реактивности не обнаружено при их взаимодействии с ИАЖ в рабочих разведениях 1/80000 – 1/160000.

Для ответа на вопрос, какие антигенные детерминанты можно выявить с помощью пула антител, входящих в состав ИАЖ, проведены электрофоретическое разделение и иммуноблоттинг лизатов клеток штаммов – представителей определенных групп: *V. cholerae* R-варианта, *V. cholerae* nonO1/nonO139, а также тест-штаммов *V. cholerae* O1. На рисунке представлена блотограмма клеточных лизатов исследуемых штаммов, обработанных ИАЖ-2, полученная к клеткам холерных вибрионов R-варианта (№ 18298).

Таблица 1 / Table 1

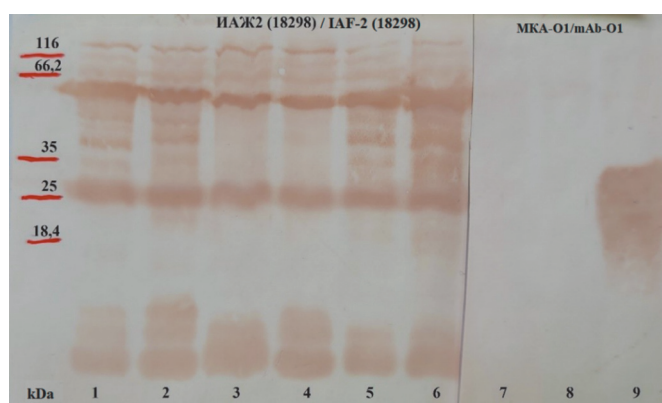
Специфическая активность иммунных асцитических жидкостей в реакции слайд-агглютинации (РА) и непрямом иммуноферментном анализе (ИФА)

Specific activity of immune ascitic fluids (IAF) in slide-agglutination reaction (AR) and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Иммунная асцитическая жидкость Immune ascitic fluids	Титр в РА Titer in agglutination reaction						Титр в ИФА (ОПср) Titer in ELISA (average OD)						
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/10000	1/20000	1/40000	1/80000	1/160000	1/320000	1/640000
ИАЖ-1 (№ 16290) IAF-1 (No. 16290)	+	+	+	–	–	–	0,718±0,01	0,638±0,01	0,639±0,01	0,574±0,01	0,436±0,01	0,300±0,01	0,124±0,01
ИАЖ-2 (№ 18298) IAF-2 (No. 18298)	+	+	+	+	+	–	0,690±0,01	0,619±0,01	0,607±0,02	0,626±0,01	0,657±0,01	0,609±0,01	0,390±0,01
ИАЖ-3 (№ 18138) IAF-3 (No. 18138)	+	+	+	+	+	–	0,684±0,02	0,607±0,01	0,608±0,01	0,494±0,01	0,358±0,01	0,271±0,02	0,114±0,01
							K ⁺					0,717±0,01	
							K [–]					0,158±0,01	

Примечание: в табл. 1 представлены средние арифметические оптических плотностей (ОПср) и среднее квадратичное отклонение; K⁺ (положительный контроль), K[–] (отрицательный контроль).

Note: the table 1 presents arithmetic mean values for optical densities (average OD) and mean square deviation; K⁺ (positive control), K[–] (negative control).



Иммуноблот бактериальных лизатов штаммов *V. cholerae* с ИАЖ-2 (№ 18298) и МКА-O1:

1 – *V. cholerae* R-варианта № 16290, 2 – № 18298; 3 – тест-штаммы *V. cholerae* O1 № 12214, 4 – № 1391; 5 – *V. cholerae* nonO1/nonO139 № 14904, 6 – № 20553; 7 – *V. cholerae* R-варианта № 18298; 8 – *V. cholerae* nonO1/nonO139 № 20553; 9 – *V. cholerae* O1 № 12214

Immunoblot of bacterial lysates of *V. cholerae* strains with immune ascitic fluids IAF-2 (No. 18298) and monoclonal antibodies (mAb-O1):

1 – *V. cholerae* R-variant No. 16290, 2 – No. 18298; 3 – test strains of *V. cholerae* O1 No. 12214, 4 – No. 1391; 5 – *V. cholerae* nonO1/nonO139 No. 14904, 6 – No. 20553; 7 – *V. cholerae* R-variant No. 18298; 8 – *V. cholerae* nonO1/nonO139 No. 20553; 9 – *V. cholerae* O1 No. 12214

Сравнительный анализ полос на блотограмме показывает, что в области 55–60 и 25 кДа выявляются мажорные белки, общие для всех штаммов, независимо от их принадлежности к соответствующей серологической группе. Наглядные отличия наблюдаются по минорным белкам в области 30–55 кДа. Так, штаммы – представители *V. cholerae* R-варианта и *V. cholerae* nonO1/nonO139 имеют несколько общих минорных полос в этой зоне, в отличие от типичных холерных вибрионов в S-форме, у которых аналогичные полосы отсутствуют. Локализованная в нижней части блотограммы широкая зона представлена у всех испытуемых штаммов и принадлежит, по-видимому, кор-олигосахариду. При обработке мембраны моноклональными антителами к O1-антигену *V. cholerae* (МКА-O1) [19] соответствующая ему зона ЛПС у атипичных штаммов не окрашивается (треки 7 и 8, трек 9 – положительный контроль), т.е. эпитопы ЛПС, характерные для типичных холерных вибрионов серогруппы O1, отсутствуют у изолятов *V. cholerae* R-варианта и *V. cholerae* nonO1/nonO139. В лизатах штаммов из группы *V. cholerae* O1 на блотограмме также обнаружены эпитопы ЛПС (фото не представлено). На основании данных блотограммы можно констатировать, что ИАЖ в своем составе содержат антитела к эпитопам коровой части ЛПС и поверхностных белков, большая часть из них являются общими для исследуемых групп холерных вибрионов.

С учетом сведений о составе и эпитопной направленности антител ИАЖ оценена их специфическая активность в реакции слайд-агглютинации на широком наборе штаммов, относящихся к трем различным серологическим группам. В работу брали ИАЖ в рабочих разведениях и живые культуры

штаммов *V. cholerae* O1, *V. cholerae* RO и *V. cholerae* nonO1/nonO139, а также тест-штаммов.

Как видно из табл. 2, экспериментальные ИАЖ в реакции слайд-агглютинации проявляли различную специфическую активность в отношении исследуемых штаммов. Отрицательная реакция всех ИАЖ зарегистрирована с клетками тест-штамма *V. cholerae* O139.

Наряду с реакцией агглютинации иммунологическую активность ИАЖ оценили в ИФА с атипичными холерными вибрионами (табл. 3).

Как оказалось, в иммуноферментном анализе каждая из трех ИАЖ взаимодействовала с 80–100 % штаммов – представителей испытуемых групп. Объяснить это можно тем, что, во-первых, иммуноферментный анализ является более чувствительным методом, чем реакция агглютинации на стекле, во-вторых, в реакции агглютинации участвуют антигенные детерминанты, локализованные на поверхности нативной бактериальной клетки, представленные большей частью О-полисахаридными цепями ЛПС, либо кор-олигосахаридом ЛПС. В ИФА для сенсibilизации лунок использовали целые клетки холерных вибрионов, убитые кипячением. Возможно, термобработка приводит к частичной деградации ЛПС, и мембранные белки становятся более доступными для взаимодействия с иммуноглобулинами. В составе нативной бактериальной клетки ЛПС «экранирует» эпитопы мембранных белков (конформационная «закрытость»), что наблюдается в реакции слайд-агглютинации. Поскольку ИАЖ являются поликлональными сыворотками и содержат пул антител к различным антигенным детерминантам: ЛПС, мембранным белкам и кор-олигосахариду, – то в ИФА происходит взаимодействие специфических иммуноглобулинов со всеми антигенами, представленными на поверхности инактивированной бактериальной клетки, чем и обусловлено выявление большего количества штаммов.

В задачи данной работы входило получение ИАЖ к R-вариантам и оценка их активности на широкой выборке атипичных холерных вибрионов. В реакциях агглютинации и ИФА мы наблюдали различные варианты взаимодействия иммуноглобулинов с атипичными по агглютинабельности штаммами. Основными поверхностными антигенами R-форм холерных вибрионов являются R-ЛПС и мембранные белки, которые детерминируют синтез антител при использовании их в качестве иммуногена. В нашей работе иммунизация биопробных животных проведена клетками штаммов из группы *V. cholerae* R-варианта, при этом антительный ответ сформировался преимущественно против иммунодоминантных эпитопов поверхностных белков и R-ЛПС. Оценка специфической активности полученных ИАЖ в серологических реакциях со штаммами холерных вибрионов показала, что они вступали в реакцию с большинством штаммов из группы *V. cholerae* nonO1/nonO139, что обусловлено наличием

Таблица 2 / Table 2

Результаты слайд-агглютинации иммунных асцитических жидкостей с набором штаммов *V. cholerae*Results of slide agglutination of immune ascitic fluids with *V. cholerae* strains

Группы штаммов <i>V. cholerae</i> Groups of <i>V. cholerae</i> strains	Количество штаммов, взятых в исследование Number of strains under the study	ИАЖ / количество штаммов с положительной реакцией в слайд-агглютинации IAF / number of strains with positive agglutination					
		ИАЖ-1 (№ 16290) IAF-1 (No. 16290)		ИАЖ-2 (№ 18298) IAF-2 (No. 18298)		ИАЖ-3 (№ 18138) IAF-3 (No. 18138)	
		абс. кол-во abs. number	уд. вес от общ. кол-ва, % proportion out of the total number, %	абс. кол-во abs. number	уд. вес от общ. кол-ва, % proportion out of the total number, %	абс. кол-во abs. number	уд. вес от общ. кол-ва, % proportion out of the total number, %
<i>V. cholerae</i> O1	20	1*	5	2*	10	2	10
<i>V. cholerae</i> R-варианта <i>V. cholerae</i> R-variant	7	2	28,6	3	42,8	1	14,3
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139	36	7	19,4	16*	44,4	12*	33,3
<i>V. cholerae</i> O1 (токсигенные тест-штаммы № 12214 El Tor, 1391 classical) <i>V. cholerae</i> O1 (toxigenic test strain No. 12214 El Tor, 1391 classical)	2	2	100	0	0	0	0
<i>V. cholerae</i> O139 (токсигенный тест-штамм № 16064) <i>V. cholerae</i> O139 (toxigenic test strain No. 16064)	1	0	0	0	0	0	0
<i>V. cholerae</i> classical R-вариант (токсигенный тест-штамм № 16197/1) <i>V. cholerae</i> classical R-variant (toxigenic test strain No. 16197/1)	1	1	100	0	0	0	0
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 (нетоксигенный штамм № P-9741) <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 (nontoxigenic strain No. P-9741)	1	0	0	0	0	0	0

Примечание: * номера штаммов совпадают.

Note: * strain numbers are the same.

Таблица 3 / Table 3

Оценка специфической активности иммунных асцитических жидкостей в ИФА на выборке штаммов *V. cholerae*Evaluation of specific activity of immune ascitic fluids in ELISA on a sample of *V. cholerae* strains

Штаммы <i>V. cholerae</i> <i>V. cholerae</i> strains	Количество штаммов, взятых в исследование Number of strains under the study	ИАЖ / количество штаммов с положительной реакцией в ИФА IAF / number of strains with a positive reaction in ELISA					
		ИАЖ-1 (№ 16290) IAF-1 (No. 16290)		ИАЖ-2 (№ 18298) IAF-2 (No. 18298)		ИАЖ-3 (№ 18138) IAF-3 (No. 18138)	
		абс. кол-во abs. number	уд. вес от общ. кол-ва, % proportion out of the total, %	абс. кол-во abs. number	уд. вес от общ. кол-ва, % proportion out of the total, %	абс. кол-во abs. number	уд. вес от общ. кол-ва, % proportion out of the total, %
<i>V. cholerae</i> R-варианта <i>V. cholerae</i> R-variant	7	6	85	7	100	6	85
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139	10	8	80	10	100	7	85

ем у них множества общих антигенных детерминант, и этот факт безусловно заслуживает дальнейшего анализа. Положительная реакция ИАЖ с отдельными штаммами в S-форме, агглютинирующимися O1 и серовароспецифическими сыворотками, свидетельствует о том, что только некоторые из штаммов сохранили эпитопы, идентичные R-вариантам. Что касается группы *V. cholerae* R-варианта, то по результатам работы очевиден вывод, что чем шире набор

ИАЖ, тем выше вероятность выявить большее число R-вибрионов, обладающих индивидуальными иммунодоминантными эпитопами кора R-ЛПС, отличающихся концевыми моносахаридами. Объединение ИАЖ в виде одного препарата представляется нам перспективным, так как позволяет охарактеризовать достаточно широкий спектр поверхностных антигенных детерминант атипичных штаммов, выделяемых из объектов окружающей среды в процессе мо-

нитинга за холерой, и затем в динамике оценить их сохранность при хранении и действии различных стрессовых факторов. На основании полученных результатов закономерен также вывод, что для обнаружения атипичных штаммов предпочтительнее использование ИФА в сравнении с реакцией слайд-агглютинации, а его достоверность и чувствительность может быть повышена за счет расширения набора ИАЖ к R-вариантам или объединения их в виде комбинированного препарата.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Биоэтика. Все эксперименты с животными выполнялись в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (протокол заседания комиссии по биоэтике от 20.04.2022 № 5).

Список литературы

1. Безсмертный В.Е., Подосинникова Л.С., Иванова С.М., Титов Г.В., Смоликова Л.М., Мазрухо Б.Л., Кругликов В.Д., Шесталтынова И.С., Монахова Е.В., Кудрякова Т.А., Авдеева Е.П., Лобанов В.В. Характеристика культур холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, изолированных от людей и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2006 году. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии (48.04). Вып. 20. Ростов-на-Дону; 2007. С. 49–53.
2. Иванова С.М., Титов Г.В., Безсмертный В.Е., Титова С.В., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Ежова М.И., Кудрякова Т.А., Зубкова Д.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды и от людей на территории Российской Федерации в 2014 году. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии (48.04). Вып. 28. Ростов-на-Дону; 2015. С. 67–70. [Электронный ресурс]. URL: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2015/06/Cholera-28-2015.pdf>.
3. Яшкуллов К.Б., Калыева Т.Б., Оброткина Н.Ф., Тюнникова В.Д., Дандаева Б.В. О свойствах культур холерных вибрионов O1, выделенных из воды открытых водоемов Республики Калмыкия в период с 2012–2014 гг. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии (48.04). Вып. 28. Ростов-на-Дону; 2015. С. 71–75. [Электронный ресурс]. URL: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2015/06/Cholera-28-2015.pdf>.
4. Иванова С.М., Иванников В.В., Мискинова Т.А., Лопатин А.А., Титова С.В., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Левченко Д.А., Чемисова О.С., Гаевская Н.Е., Ежова М.И., Непомнящая Н.Б. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2017 году. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии (48.04). Вып. 31. Ростов-на-Дону; 2018. С. 48–51. [Электронный ресурс]. URL: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2019/01/СБОРНИК-31.pdf>.
5. Мошкина А.А. Свойства забайкальских штаммов холерных вибрионов O1, выделенных за последние пять лет. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии (48.04). Вып. 32. Ростов-на-Дону; 2019. С. 110–12. [Электронный ресурс]. URL: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2019/11/Холера-и-патогенные-для-человека-вибрионы-выпуск-32.pdf>.
6. Черепашкина И.Я., Балахнова В.В., Подосинникова Л.С., Огнева Н.С., Сорокин В.М., Прозорова Л.А., Фецайлова О.П., Чиркова О.О. Современные подходы к изучению антигенной вариативности холерных вибрионов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1996; 4:85–6.
7. Лобанов В.В., Сухарь В.В. Особенности липополисахарида *Vibrio cholerae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2002; 2:102–7.
8. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Якушева О.А., Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Зюзина В.П., Яговкин М.Э. Изучение с помощью панели МКА поверхностных антигенных детерминант атипичных по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 1:77–85. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-77-85.
9. Климович В.Б., Самойлович М.П., Грязева И.В., Крутецкая И.Ю., Пашкова С.Ф., Руденко И.Я. Моноклональные антитела на основе репертуара иммунного ответа мышей линии SJL/J. *Медицинская иммунология*. 1999; 1(1-2):47–58.
10. Нуралова И.В. Способ получения хламидийного люминесцирующего диагностического препарата, хламидийный люминесцирующий диагностический препарат и способ диагностики хламидийных инфекций. Патент РФ № 2141666, опубл. 20.11.1999.
11. Подоплека Л.Е., Шарова О.И., Унгер Г.Н. Способ получения антител для производства диагностических препаратов вируса клещевого энцефалита. Патент РФ № 2063245, опубл. 10.07.1996.
12. Девдариани З.Л., Федорова В.А., Веренков М.С., Чижиньков А.И., Кочетов А.Х. Беспородные мыши – биопродукты моноклональных антител к капсульному антигену возбудителя чумы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1992; 2:73–4.
13. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Якушева О.А., Алексеева Л.П., Водопьянов С.О., Ежова М.И., Носков А.К. Изучение диапазона изменчивости по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных при мониторинговых исследованиях. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:107–14. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-107-114.
14. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Подойничина О.А., Непомнящая Н.Б., Селянская Н.А., Водопьянов А.С., Ежова М.И., Ренгач М.В., Носков А.К. Комплексная характеристика штаммов *Vibrio cholerae* – R-вариант. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2023; 19(1):6–14.
15. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб.; 2012. 48 с. [Электронный ресурс]. URL: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf.
16. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.; 1991. 288 с.
17. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
18. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding – current status and outlook. *J. Immunol. Methods*. 1984; 72(2):313–40. DOI: 10.1016/0022-1759(84)90001-2.
19. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С. Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(5):303–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307.

References

1. Bezsmertny V.E., Podosinnikova L.S., Ivanova S.M., Titov G.V., Smolikova L.M., Mazruho B.L., Kruglikov V.D., Shestaltynova I.S., Monakhova E.V., Kudryakova T.A., Avdeeva E.P., Lobanov V.V. [Characteristics of cultures of cholera vibrios O1 and O139 serogroups isolated from patients and from environmental objects on the territory of the Russian Federation in 2006. In: [Cholera and Pathogenic for Humans Vibrios. Proceedings of the Problem Commission (48.04). Iss. 20]. Rostov-on-Don; 2007. P. 49–53.
2. Ivanova S.M., Titov G.V., Bezsmertny V.E., Titova S.V., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., Arhangel'skaya I.V., Ezhova M.I., Kudryakova T.A., Zubkova D.A., Vodopyanov S.O., Vodopyanov A.S. [Data on the biological properties of cholera vibrios O1 serogroup isolated from environmental objects and from patients on the territory of the Russian Federation in 2014]. In: [Cholera and Pathogenic for Humans Vibrios. Proceedings of the Problem Commission (48.04). Iss. 28]. Rostov-on-Don; 2015. P. 67–70. Available from: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2015/06/Cholera-28-2015.pdf>.
3. Yashkulov K.B., Kalyaeva T.B., Obrotkina N.F., Tyunnikova V.D., Dandaeva B.V. [On the properties of cultures of cholera vibrios O1 isolated from the open water bodies of the Republic of Kalmykia in 2012–2014]. In: [Cholera and Pathogenic for Humans Vibrios. Proceedings of the Problem Commission (48.04). Iss. 28]. Rostov-on-Don; 2015. P. 71–5. Available from: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2015/06/Cholera-28-2015.pdf>.
4. Ivanova S.M., Ivannikov V.V., Miskina T.A., Lopatin A.A., Titova S.V., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., Arkhangel'skaya I.V., Levchenko D.A., Chemisova O.S., Gaevskaya N.E., Ezhova M.I., Nepomnyashchaya N.B. [Information on the biological properties of

cholera vibrios O1 serogroup isolated from environmental objects on the territory of the Russian Federation in 2017]. In: [Cholera and Pathogenic for Humans Vibrios. Proceedings of the Problem Commission (48.04). Iss. 31]. Rostov-on-Don; 2018. P. 48–51. Available from: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2019/01/SBORNIK-31.pdf>.

5. Moshkina A.A. [Properties of Transbaikalian strains of cholera vibrios O1 isolated over the past five years]. In: [Cholera and Pathogenic for Humans Vibrios. Proceedings of the Problem Commission (48.04). Iss. 32]. Rostov-on-Don; 2019. P. 110–12. Available from: <http://antiplague.ru/wp-content/uploads/2019/11/Холера-и-патогенные-для-человека-вибрионы-выпуск-32.pdf>.

6. Cherepakina I.Ya., Balakhnova V.V., Podosinnikova L.S., Ogneva N.S., Sorokin V.M., Prozorova L.A., Fetsailova O.P., Chirkova O.O. [Modern approaches to the study of antigenic variability of cholera vibrios]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 1996; (4):85–6.

7. Lobanov V.V., Sukhar' V.V. [Features of *Vibrio cholerae* lipopolysaccharide]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2002; (2):102–7.

8. Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Yakusheva O.A., Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Zyuzina V.P., Yagovkin M.E. [Study of the surface antigenic determinants of *Vibrio cholerae* strains with atypical agglutinability using the panel of monoclonal antibodies]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; (1):77–85. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-77-85.

9. Klimovich V.B., Samojlovich M.P., Gryazeva I.V., Krutetskaya I.Yu., Pashkova S.F., Rudenko I.Ya. [Monoclonal antibodies based on the immune response repertoire of SJL/J mice]. *Meditsinskaya Immunologiya* [Medical Immunology]. 1999; 1(1-2): 47–58.

10. Nuralova I.V. [A method for producing a chlamydial luminescent diagnostic drug, a chlamydial luminescent diagnostic drug and a method for diagnosing chlamydial infections]. RF Patent No. 2141666, publ. 20 Nov 1999.

11. Podoplekina L.E., Sharova O.I., Unger G.N. [Method for obtaining antibodies for the production of tick-borne encephalitis virus diagnostic drugs]. RF Patent No. 2063245, publ. 10 July 1996.

12. Devdariani Z.L., Fedorova V.A., Verenkov M.S., Chizhin'kov A.I., Kochetov A.Kh. [Outbred mice are bioproducers of monoclonal antibodies to the capsular antigen of the plague pathogen]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 1992; (2):73–4.

13. Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Arhangel'skaya I.V., Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Vodop'yanov S.O., Ezhova M.I., Noskov A.K. [Assessment of the variation range of agglutinability in *Vibrio cholerae* strains isolated in the course of monitoring studies]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; (3):107–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-107-114.

14. Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Podojnitsyna O.A., Nepomnyashchaya N.B., Selyanskaya N.A., Vodop'yanov A.S., Ezhova M.I., Rengach M.V., Noskov A.K. [Complex characteristics of *Vibrio cholerae* strains – R-variant]. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov*. 2023; 19(1):6–14.

15. [Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of European Union on the protection of animals used for scientific purposes]. St. Petersburg; 2012. 48 p. [Internet]. Available from: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf.

16. Egorov A.M., Osipov A.P., Dzantiev B.B., Gavrilova E.M. Theory and Application of Enzyme Immunoassay. Moscow; 1991. 288 p.

17. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

18. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding – current status and outlook. *J. Immunol. Methods*. 1984; 72(2):313–40. DOI: 10.1016/0022-1759(84)90001-2.

19. Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretenchuk O.F., Kruglikov V.D., Arhangel'skaya I.V., Bursha O.S. [Enzyme immunoassay methods in the diagnosis of cholera]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* [Clinical Laboratory Diagnostics]. 2016; 61(5):303–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307.

Authors:

Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Yakusheva O.A., Levchenko D.A., Rengach M.V. 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:

Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Якушева О.А., Левченко Д.А., Ренгач М.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.