

Н.Е.Терешкина, Е.А.Михеева, З.Л.Девдариани, А.К.Адамов, Г.В.Григорьева

ИММУНОДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Представлен обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященный вопросам совершенствования иммунодиагностики холеры. Рассмотрены проблемы и перспективы конструирования различных препаратов, предназначенных для обнаружения холерных вибрионов и серологической диагностики заболевания.

Ключевые слова: холера, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio cholerae* O139, иммунодиагностика, серодиагностика, иммунодиагностические препараты.

Холера – тяжелая острая инфекционная болезнь, вызываемая токсигенными штаммами холерного вибриона O1 и O139 серогрупп [19, 22, 34, 42]. В условиях продолжающейся седьмой пандемии холеры активные миграционные процессы и существование современных высокоскоростных транспортных средств создают постоянную угрозу заноса инфекции в любую точку земного шара в кратчайшие сроки. Противоэпидемические мероприятия по недопущению распространения этой особо опасной инфекции во многом зависят от того, насколько быстрые и точные методы используются для обнаружения холерного вибриона. Поэтому сохраняется актуальность совершенствования имеющихся и разработки новых средств лабораторной диагностики холеры и, в частности, иммунодиагностики как одного из наиболее технически простых и экспрессных методов детекции бактериальных патогенов.

Иммунодиагностика холеры включает в себя комплекс иммунологических реакций, различающихся по регистрируемому эффекту и технике постановки, основанных на взаимодействии специфических антигенов холерного вибриона и гомологичных антител [3, 42]. Иммунологические методы диагностики холеры используются как в рамках бактериологического исследования (ускоренные методы обнаружения возбудителя и идентификации культур) [3, 14, 42], так и самостоятельно – для индикации холерного вибриона в материале, зараженном этим возбудителем [31, 47], и при проведении серологических исследований с целью ретроспективного выявления переболевших и вибрионосителей, а также оценки эффективности вакцинопрофилактики [3, 14, 20, 42, 48, 55].

Как известно, все представители вида *Vibrio cholerae* имеют сходные культурально-морфологические и биохимические свойства, но отличаются структурой липополисахарида (ЛПС), а именно его О-полисахаридных цепей (О-антигена), определяющей серологическую специфичность вибрионов [34, 42]. Поскольку к возбудителям холеры относят *V. cholerae* только двух – O1 и O139 – серогрупп [14, 22, 34, 42], а с вибрионами остальных известных к настоящему времени серогрупп связывают только спорадические случаи диарейных и экстраинтести-

нальных инфекций [34, 42], ключевым диагностическим моментом является определение сероваропринадлежности холерного вибриона, осуществляемое в современных условиях преимущественно с применением иммунологических реакций.

Для определения принадлежности холерных вибрионов к O1 серогруппе наиболее часто применяется реакция агглютинации (РА) на стекле (слайд-агглютинация) или в пробирках (объемная или развернутая РА), а также разные модификации ее постановки микрометодом с использованием как выделенной культуры, так и материала от больного [3, 17, 28, 42]. В сравнении с развернутой РА микрометод менее трудоемок, экономичен и экспрессен [28]. При этом в 92–95 % случаев результаты постановки РА в микрообъемах и в пробирках совпадают [28]. Представляет интерес методика постановки РА микрометодом в полистироловых панелях с применением красителя – щелочного метиленового синего Леффлера, к достоинствам которой можно отнести демонстративность и простоту объективного учета [17].

РА была одним из первых методов, предложенных для идентификации холерного вибриона O139, впервые описанного в начале 90-х годов прошлого столетия [19, 22, 34, 42]. В многочисленных исследованиях показана эффективность слайд-агглютинации и объемной РА с серовароспецифической поликлональной сывороткой [12, 16, 27, 52] или МКА [5, 39, 46].

Несмотря на то, что РА представляет собой наиболее простой и широко применяемый метод определения сероваропринадлежности *V. cholerae*, регламентированный методическими указаниями (МУК) по лабораторной диагностике холеры [14], он имеет отдельные недостатки, к которым относятся невысокая чувствительность, субъективность оценки результатов, возможность ложноположительных реакций в случае спонтанной агглютинации или вследствие остаточной перекрестной реактивности при использовании поликлональных адсорбированных сывороток [3]. Кроме того, из объектов внешней среды и от людей нередко выделяются штаммы холерных вибрионов со сниженной агглютинабельностью [3, 42], что не исключает вероятности получения ложноотрицательного результата в РА. Это, в частности, подтверждается результатами экспери-

ментов О.И.Сальниковой с соавт. [21], получившими инагглютинабельные мутанты природных штаммов *V. cholerae* O139, нереакционноспособные в РА, но сохранившие активность в других использованных в работе серологических реакциях.

Другим агглютинационным тестом, используемым для обнаружения холерного вибриона, является реакция коаггутинации (РКоА). Простота постановки, отсутствие необходимости в специальном оборудовании и дорогостоящих материалах, быстрота получения ответа позволяют рекомендовать РКоА в качестве высокочувствительного экспресс-метода определения соматического антигена *V. cholerae* O1 [49]. Антительный коаггулинирующий диагностикум на основе коммерческой холерной O1 сыворотки (Саратов) оказался эффективным для определения содержания О-антигена в надосадочной жидкости холерных вибрионов и контроля чистоты получения препарата энтеротоксина [7]. Хотя РКоА характеризуется большей наглядностью, чем РА, она не лишена других присущих последней недостатков, особенно если для приготовления диагностикума применяют поликлональные иммуноглобулины. Так, коаггулинирующий диагностикум на основе антител, выделенных из поликлональной сыворотки против холерного вибриона O139 серогруппы, был с успехом использован для серологической идентификации возбудителя, но не для его индикации [11]. Моноклональные коаггулинирующие тесты, вследствие большей специфичности использованного иммунореагента, оказались эффективными для быстрого выявления возбудителя в образцах клинического материала и пробах воды, хотя и их чувствительность и специфичность не всегда достигали 100 % [36, 47].

К экспрессным методам иммунодиагностики холеры относится реакция иммобилизации вибрионов (РИВ), которая дает возможность бактериоскопически обнаружить возбудитель в течение нескольких минут при его концентрации не менее $1 \cdot 10^5$ м. кл./мл при исследовании нативного материала или культуры вибрионов [14]. При наличии в образце возбудителей холеры добавление к исследуемой капле О-агглютинирующей холерной сыворотки [14, 19, 42] или МКА [14, 42, 46] вызывает обездвиживание отдельных микробных клеток и образование неподвижных микроагглютинатов немедленно или в течение 1–2 мин [14]. Хотя данный метод, будучи, как и РА, официально рекомендованным МУК «Лабораторная диагностика холеры» [14], отличается быстротой получения результата и позволяет дать первый сигнальный ответ уже через 15–20 мин от начала исследования материала, при его проведении возможны неспецифические взаимодействия, а отрицательный результат в РИВ не исключает диагноза холеры [14].

Эритроцитарные антигенные и антительные препараты давно широко и успешно применяются для диагностики различных бактериальных инфекций, в том числе холеры. Постановка реакции не-

прямой гемагглютинации (РНГА) с использованием диагностикума эритроцитарного холерного иммуноглобулинового предусмотрена действующими методическими указаниями по лабораторной диагностике холеры [14]. Экспериментальный холерный О-иммуноглобулиновый эритроцитарный диагностикум позволяет выявлять в РНГА вибрионы O1 серогруппы серотипов Огава и Инаба в концентрации $1,5 \cdot 10^5$ и $7,5 \cdot 10^5$ м.кл. соответственно, а также гомологичные антитела к ним в реакции нейтрализации антигена (РНАг) [24].

Ряд эритроцитарных диагностикумов предложен и для обнаружения холерных вибрионов O139. На основе лизата, полученного из ацетонвысушенных клеток *V. cholerae* MO45, сконструирован специфичный холерный диагностикум для идентификации чистых культур *V. cholerae* O139 как в РНГА, так и в реакции нейтрализации антител (РНАт) с порогом чувствительности $2,5 \cdot 10^7 - 1,5 \cdot 10^6$ м.к./мл [15]. Следует, однако, отметить, что хотя гемагглютинационные тесты достаточно эффективны, их применение имеет определенные ограничения, поскольку входящие в состав диагностикумов реагенты нестабильны, а по показателю чувствительности они уступают современным иммунодиагностическим методам [13].

Одно из ведущих мест в экспресс-диагностике холеры занимает метод флуоресцирующих антител (МФА). Имеются сообщения об использовании техники флуоресцирующих антител для детекции возбудителя холеры в образцах стула и в пробах воды [30, 42]. Иммунофлуоресцентный метод на основе поликлональных антител к белкам внешней мембраны *V. cholerae* O1 был эффективен при выявлении соответствующего микроорганизма при концентрации 240 КОЕ/мл в образце [35].

Для детекции *V. cholerae* O139 в прямом МФА сконструирован диагностический препарат на основе поликлональных адсорбированных кроличьих иммуноглобулинов к О-антигену холерного вибриона гомологичной серогруппы [2]. Продемонстрирована также высокая чувствительность и специфичность моноклональных иммунофлуоресцентных препаратов как при идентификации чистых культур *V. cholerae* O139, так и индикации возбудителя в различном инфицированном материале [4, 36, 46]. Не отрицая безусловной диагностической ценности МФА, необходимо отметить, что при его применении возможны ложноположительные результаты, особенно в случае использования поликлональных флуоресцирующих иммуноглобулинов за счет их кросс-реактивности, обуславливающей неспецифическое свечение посторонней микрофлоры [14], и ложноотрицательные результаты – при наличии в материале атипичных форм *V. cholerae* или концентрации микроорганизмов ниже порога чувствительности анализа.

При обнаружении холерного вибриона хорошо зарекомендовал себя иммуноферментный анализ (ИФА) или ELISA (от англ. enzyme-linked immunosorbent assay) как высокочувствительный, воспроиз-

водимый и наглядный современный иммунодиагностический метод. Детекция *V. cholerae* в различных вариантах ИФА основывается на применении поли- и моноклональных антител к различным антигенам микроорганизма, например, кроличьих иммуноглобулинов к гликопротеину возбудителя холеры [10], белкам внешней мембраны *V. cholerae* O1 Огава, O1 Инаба и *V. cholerae* O139 [43], ЛПС *V. cholerae* O139 [25]. Быстрым и чувствительным способом обнаружения возбудителя в материале от больных представляется дот-ELISA на основе МКА к ЛПС *V. cholerae* O139, однако в единичных случаях были зафиксированы ложноположительные результаты [31]. Использование ИФА является перспективным также и при диагностике глубоко измененных по антигенной структуре штаммов холерных вибрионов [26], а также некультивируемых форм *V. cholerae* [23].

Принцип непрямого сэндвич-ELISA был использован при разработке амперометрического иммуносенсора для быстрой детекции *V. cholerae* O1 на основе высокоспецифичных поликлональных антител [50]. Чувствительность метода составила $1 \cdot 10^5$ м.кл./мл, а продолжительность анализа 55 мин. Сообщается также о конструировании иммуносенсора на основе МКА к *V. cholerae* O1 с чувствительностью $1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^9$ м.кл./мл [40].

Весьма перспективным методом экспресс-диагностики холеры является применение иммунохроматографических дипстиков [41, 45, 54]. Чувствительность и специфичность данного метода, однако, не всегда удовлетворительны – в зависимости от использованного теста, исследуемого материала и навыков персонала, осуществляющего постановку анализа, они колеблются от 58 и 67 до 95 и 97 % соответственно [41, 54], редко достигая 100 % [45].

Наряду с принадлежностью *V. cholerae* к O1 или O139 серогруппе, маркером эпидемического потенциала холерного вибриона является его токсигенность [19, 34]. В связи с этим, большое внимание уделяется конструированию иммунодиагностикомов для определения холерного токсина (ХТ). В соответствии с принятой схемой лабораторной диагностики холеры заключение о холерогенности *V. cholerae* основывается на результатах внутрикишечного заражения крольчат-сосунков или оценке гемолитической активности и чувствительности к специфическим фагам, а также результатах полимеразной цепной реакции (ПЦР) [14]. Поскольку продолжительность бактериологических анализов составляет не менее 18–20 ч с момента поступления материала на исследование, а применение генодиагностических методов имеет ряд ограничений, продолжают разрабатываться альтернативные способы обнаружения ХТ, обеспечивающие получение результата в более короткий срок. С этой целью создан целый ряд экспериментальных иммунодиагностикомов.

Так, Ю.А.Белой и соавт. [7] предложен антительный коаггулинирующий диагностиком, обнаруживающий очищенный холерный энтеротоксин в растворах

в количестве 1–10 нг/мл. Высокой чувствительностью и специфичностью обладал тест латекс-агглютинации, разработанный R.J.Almeida *et al.* [29].

Оригинальный иммунофлуоресцентный метод с использованием ганглиозид-содержащей DASS-системы (или системы шарообразных субстратов для определения антигенов) и люминесцирующей холерной антитоксической сыворотки оказался весьма эффективным при определении холерогена [8]. С помощью специфических МКА к В-субъединице ХТ методом непрямо́й иммунофлуоресценции удалось обнаружить гомологичный антиген непосредственно на поверхности вибрионов на ранних этапах культивирования [6].

При определении холерогена за рубежом широко применяются методы иммуноферментного анализа [42]. Отечественными учеными на основе МКА к В-субъединице ХТ разработан прямой и сэндвич-вариант ДИА для идентификации токсигенных штаммов *V. cholerae*, обеспечивающие обнаружение ХТ в культуральной жидкости и микробных клетках. Более эффективным оказался сэндвич-вариант ДИА, в котором регистрировалось $2,4 \cdot 10^6 - 4,9 \cdot 10^6$ м.кл./мл, что соответствовало 16 нг/мл ХТ. Длительность анализа составляла не более 1–1,5 ч для сэндвич-варианта и 40–50 мин – для прямого ДИА [9].

S.L.Mousavi *et al.* [44] сообщают об успешной попытке применения сочетанного метода ПЦР-ИФА для выявления токсигенных штаммов *V. cholerae* O1. Предел чувствительности метода составлял 0,5 пг ДНК и 5 бактериальных клеток.

Учеными из Тайваня разработан оригинальный иммуносенсор, основанный на комбинированном использовании GM₁-липосом и антител к ХТ в проточной системе с регистрацией сигнала специфической флуоресценции, позволяющий выявлять $6,6 \cdot 10^{-17}$ г/мл холерного токсина в образцах объемом 200 мкл [37].

Для одновременной детекции токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, O139, не O1 и не O139 в клинических образцах и образцах воды индийскими учеными предложен дипстик-ELISA на основе поли- и моноклональных антител к двум рекомбинантным белкам – В-субъединице холерного токсина и белку внешней мембраны OmpW [53].

Наряду с индикацией и идентификацией возбудителя, лабораторная диагностика холеры предусматривает проведение серологических исследований по определению в сыворотках больных, переболевших, вибрионосителей и вакцинированных людей специфических антител [14, 20, 42, 48, 55]. Хотя серологической диагностике холеры отводится вспомогательная роль, она остается незаменимой при проведении ретроспективных исследований и в качестве ориентира для проведения дополнительных бактериологических анализов с целью выявления вибрионосителей [14, 19, 42].

Для обнаружения в сыворотке крови антител, обладающих свойствами агглютининов, методически указанными по лабораторной диагностике холеры

рекомендуется постановка развернутой реакции агглютинации, РНГА с диагностикумом эритроцитарным холерным антигенным, РНАг с диагностикумом эритроцитарным холерным иммуноглобулиновым [14]. При этом целесообразно тестировать парные сыворотки, взятые с 7–10-дневным интервалом, поскольку диагностическое значение имеет нарастание специфических титров в 4 и более раз. Результат исследования первой сыворотки является ориентировочным и считается положительным, начиная с титра 1:40 [3, 14, 19]. Быстрое определение противохолерных антител в сыворотке крови можно проводить по методу Н.И.Гивенталь и З.В.Ермольевой с применением фазово-контрастного микроскопа [18].

При проведении серологических исследований применяется также реакция определения вибриоцидных антител, в присутствии которых происходит гибель холерных вибрионов [14, 18, 19]. По данным В.Н.Савельева и соавт. [20], в группе лиц с бактериологически подтвержденным диагнозом холеры или вибрионоительства вибриоцидные антитела выявляются в 100 % случаев, тогда как у лиц, не имеющих отношения к очагу холеры, вибриоцидины не обнаруживались. Для выявления антител, обладающих вибриоцидной активностью, применяют также методики, основанные на ферментации углеводов, в частности, сахарозы [14]. Копроантитела можно обнаружить с использованием непрямого люминесцентно-серологического метода [3].

Антитоксические антитела, которые длительно циркулируют в крови после перенесенной инфекции [14, 19, 42], выявляются в реакции непрямой гемагглютинации с диагностикумом эритроцитарным холерным энтеротоксическим [14], а также по их нейтрализующей активности в отношении энтеротоксина на кроликах [19].

В целом, можно отметить, что существующие способы определения антител, обладающих агглютинирующими и вибриоцидными свойствами, не отличаются экспрессностью, особенно если принимать во внимание необходимость исследования парных сывороток. Кроме того, они предполагают проведение манипуляций с живым инфекционным агентом и обладают всеми недостатками, присущими соответствующим иммунологическим реакциям. Для выявления антитоксических антител также не применяются современные иммунодиагностические методы. Это обуславливает необходимость дальнейшего совершенствования серодиагностики холеры.

Среди оригинальных экспериментальных методик, о которых сообщается в литературе последних лет, следует упомянуть реакцию блокирования теста LAL (*Limulus amoebocyte lysate*), предназначенную для определения сывороточных антител к ЛПС *V. cholerae* O139. Титры в указанной реакции сравнимы с титрами вибриоцидных антител, что делает ее перспективной для серологических исследований [32]. Группа исследователей из Бангладеш в качестве «долгосрочного» маркера иммунного ответа к холере предложила

определять в стандартном дот-ELISA В-клетки памяти, специфичные к холерному токсину [38].

Кроме вибриоцидных антител, в качестве иммунологических маркеров, ассоциированных с холерной инфекцией, зарубежными исследователями предлагается рассматривать сывороточные IgA к В-субъединице холерного токсина, ЛПС и антигену токсин-корегулируемых пилей адгезии TcpA *V. cholerae* O1 [51]. При клиническом изучении иммунного ответа у взрослых и детей в Бангладеш были установлены определенные закономерности в продукции антител к вышеперечисленным антигенам в разных возрастных группах при инфекции и вакцинации [33].

Из вышеизложенного становится очевидным, что, несмотря на более чем столетнюю историю развития методов лабораторной диагностики холеры, проблема ее совершенствования по-прежнему остается в поле внимания исследователей. Хотя в настоящее время предложено большое количество самых разнообразных способов иммуно- и серодиагностики холеры, большая их часть – экспериментальные разработки. В России выпускаются лишь несколько имеющих государственную регистрацию препаратов старого поколения, в частности диагностические холерные адсорбированные сухие сыворотки О, Инаба, Огава, РО и О139, предназначенные для идентификации чистых культур, и иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные адсорбированные, позволяющие выявлять и идентифицировать *V. cholerae* O1 в мазках из различных материалов и чистых культур. Современные высокочувствительные и экспрессные тест-системы, в том числе для ретроспективной диагностики, не внедрены в практику отечественного здравоохранения.

В последние годы все более широкое применение в микробиологии и эпидемиологии находят генодиагностические методы. Однако, несмотря на высокую чувствительность и специфичность, они обладают рядом недостатков, к наиболее значительным из которых следует отнести необходимость использования дорогостоящего оборудования, реактивов и особой организации помещений для проведения анализа, что ограничивает возможность их использования в полевых условиях и в слабо оснащенных лабораториях. Кроме того, в пробах из внешней среды и образцах стула нехолерных больных иногда содержатся примеси, ингибирующие ПЦР [1, 42].

В наибольшей степени требованиям экспрессности, относительно невысокой стоимости, простоты технического исполнения и учета результатов отвечают именно иммунологические методы обнаружения холерного вибриона. Следует особо подчеркнуть, что эффективность последних главным образом зависит от качества используемых специфических иммунореагентов, в связи с чем очевидна необходимость оптимизации технологии их получения. Способствовать решению этой задачи может практическое использование достижений современной фундаментальной иммунологии и молекулярной

иммунобиологии, подразумевающее целенаправленное влияние на иммунный ответ биопродуцента за счет применения расширенной панели антигенов для иммунизации, в частности, изолированных с помощью современных и классических биохимических методов, позволяющих максимально сохранить иммунореактивность специфических эпитопов, выбора оптимальных условий иммунизации, использования биомоделей с определенными свойствами иммунной системы, закрепленными генетически. Несомненна перспективность использования гибридной биотехнологии, позволяющей получать высокоаффинные антитела уникальной специфичности к отдельным антигенным детерминантам диагностически значимых антигенов *V. cholerae*. Применение указанных подходов позволит получить поли- и моноклональные антитела, пригодные для конструирования более совершенных тест-систем для диагностики холеры, включая иммуносенсоры и биочипы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абгарян А.Г., Еременко Е.И., Ефременко В.И., Афанасьев Е.Н., Жарникова И.В. Совершенствование метода индикации возбудителя сибирской язвы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2003; 6 (Приложение):47–51.
2. Абрамова Е.Г. Разработка биотехнологической схемы получения флуоресцирующих иммуноглобулинов для идентификации холерных вибрионов O139 серогруппы [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Саратов, 2005.
3. Адамов А.К., Наушнина М.С. Холерные вибрионы. Саратов: Изд-во СГУ; 1981. 328 с.
4. Алексеева Л.П., Мазрухо Б.Л., Маркина О.В., Чемисова О.С., Сальникова О.И., Ишина Е.В. Получение диагностически флуоресцирующих моноклональных иммуноглобулинов к *V. cholerae* O139 серовара. Клин. лаб. диагностика. 2002; 12:С. 50–1.
5. Алексеева Л.П., Сальникова О.И., Мазрухо Б.Л., Маркина О.В., Чемисова О.С., Лобанов В.В. Моноклональные антитела к липополисахариду *Vibrio cholerae* O139. Биотехнология. 2002; 2:79–84.
6. Аленкина Т.В., Грачева И.В., Девдариани З.Л. Обнаружение холерного энтеротоксина на поверхности клеток холерного вибриона методом непрямой иммунофлуоресценции. В кн.: Акт. вопр. профилакт. чумы и др. инф. забол. Ставрополь; 1994. С. 117.
7. Белая Ю.А., Гайлонская И.Н., Быстрова С.М., Ферантонтов Г.К. Определение холерного энтеротоксина с помощью реакции коаггутинации. Вестн. Акад. мед. наук СССР. 1984; 10:69–73.
8. Владимцева И.В., Ефременко В.И., Пушкарь В.Г., Голосеев Ю.А., Трофимов Е.Н. Иммунофлюоресцентный метод обнаружения холерного энтеротоксина. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1986; 12:62–5.
9. Девдариани З.Л., Аленкина Т.В., Федорова В.А. Экспресс-диагностика токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* в доиммунологическом анализе с помощью моноклональных антител. Клин. лаб. диагн. 1999; 8:24–33.
10. Ефанова Е.А., Глянько Е.В., Рожков Е.В., Мазрухо Б.Л., Король В.В. Использование гликопротеина возбудителя холеры для получения иммунопероксидазного диагностического препарата. В кн.: Иммунол. и специф. профилакт. особо опасных инф. Саратов; 1993. С. 252.
11. Ишина Е.В. Перспективы использования холерного O139 КоА-диагностикума в системе эпиднадзора за холерой. В кн.: Диагн., лечение и профилакт. инф. забол. Биотехнология. Ветеринария. Екатеринбург; 1999. С. 74.
12. Ишина Е.В., Мазрухо Б.Л., Непомнящая Н.Б. Получение кроличьей агглютинирующей сыворотки с использованием препарата клеточных оболочек холерного вибриона O139 серовара. В кн.: Акт. вопр. профилакт. чумы и др. инф. забол. Ставрополь, 1994. С. 132–3.
13. Каральник Б.В. Эритроцитарные диагностикумы. М.: Медицина; 1976. 164 с.
14. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007. 87 с.
15. Мазрухо Б.Л., Ишина Е.В. Холерный эритроцитарный диагностикум на основе лизата холерных вибрионов O139 серогруппы. В кн.: Матер. науч.-практ. конф., посв. 100-летию образов. противочумн. службы России. Т. 2. Саратов; 1997. С. 193.
16. Мазрухо Б.Л., Ломов Ю.М., Воронезская Л.Г., Иванова Л.В., Адамов А.К., Казакова Е.С., Лукьянова О.И. Сыворотка для идентификации эпидемически опасных холерных вибрионов O139 серовара «Бенгал». В кн.: Акт. пробл. профилакт. особо опасных и природно-очаговых инф. бол. Иркутск, 1994. С. 100.
17. Мусатов Ю.С., Юзвик Л.Н., Парфенов В.Н. Модификация реакции агглютинации при идентификации холерных вибрионов O1 группы. В кн.: Матер. науч.-практ. конф., посв. 100-летию образов. противочумн. службы России. Саратов; 1997. Т. 2. С. 199.
18. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология холеры. Саратов: Слово; 1995. 74 с.
19. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина, Шико; 2009. 472 с.
20. Савельев В.Н., Ефременко В.И., Гнутово И.Н., Киселева Т.Ф., Богданов И.К., Постовой П.П. и др. Оценка теста вибриоцидных антител в постановке диагноза холеры или вибрионозительства. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1992; 11–12:55–7.
21. Сальникова О.И., Лобанов В.В., Маркина О.В., Алексеева Л.П., Мазрухо Б.Л., Аронова Н.В. и др. Изучение измененных по признаку агглютинабельности субкультур *V. cholerae* O139 с помощью различных серологических методов. Холера и патогенные для человека вибрионы. Ростов н/Д; 2002. 15:77–8.
22. Смирнова Н.И. Возбудитель холеры новой O139-серогруппы: молекулярно-генетические особенности и происхождение. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2002; 3:23–33.
23. Соколенко А.В., Алексеева Л.П., Ломов Ю.М., Чемисова О.С. Изучение взаимодействия некультивируемых форм холерных вибрионов с моноклональными антителами к липополисахариду O1 и O139 серогруппы. Биотехнология. 2004; 3:87–92.
24. Тугамбаев Т.И., Ли Е.Е., Сулейменов Б.М., Атчабаров Б.Б. Конструирование эритроцитарного холерного O-иммуноглобулинового диагностикума. В кн.: Иммунол. и специф. профилакт. особо опасных инф. Саратов; 1993. С. 253.
25. Федорова В.А., Громова О.В., Девдариани З.Л. Иммуноферментная тест-система для детекции *Vibrio cholerae* O139 серовара. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1998; 5:77–80.
26. Черепяхина И.Я., Балахнова В.В., Бурлакова О.С., Алексеева Л.П. Использование иммуноферментного анализа и реакции коаггутинации с поликлональными и моноклональными иммуноглобулинами для диагностики атипичных по агглютинабельности штаммов холерных вибрионов. В кн.: Акт. вопр. профилакт. чумы и др. инф. забол. Ставрополь; 1994. С. 148–9.
27. Чеховская Т.В., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. Бескапсульные мутанты *Vibrio cholerae* O139 серогруппы: получение, идентификация и использование для приготвления диагностической O139 антисыворотки. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000; 1:34–7.
28. Шмеркевич Д.Л., Донская Т.Н., Маторина Н.А., Трушева О.С., Миронова Н.П., Вейнблат В.И. и др. Постановка реакции агглютинации микрометодом для идентификации холерных вибрионов. В кн.: Иммунохим. и лаб. диагн. особо опасных инф. Саратов; 1985. С. 83–6.
29. Almeida R.J., Hickman-Brenner F.W., Sowers E.G., Puhf N.D., Farmer J.J., III, Wachsmuth I.K. Comparison of a latex agglutination assay and an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting cholera toxin. J. Clin. Microbiol. 1990; 28:128–130.
30. Aulet O., Silva C., Fraga S.G., Pichel M., Cangemi R., Gaudioso C. et al. Detection of viable and viable nonculturable *Vibrio cholerae* O1 through cultures and immunofluorescence in the Tucumán rivers, Argentina. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2007; 40(4):385–90.
31. Chaicumpa W., Srimanote P., Sakolvaree Y., Kalampaheti T., Chongsa-Nguan M., Tapchaisri P. et al. Rapid diagnosis of cholera caused by *Vibrio cholerae* O139. J. Clin. Microbiol. 1998; 36:3595–600.
32. Chang H.S., Sack D.A. Detection of anti-lipopolysaccharide antibodies to *Vibrio cholerae* O1 and O139 using a novel microtiter limulus amoebocyte lysate (LAL) assay. Clin. Chem. Acta. 2001; 312:49–54.
33. Chowdhury F., Khan A.I., Harris J.B., LaRocque R.C., Chowdhury M.I., Ryan E.T. et al. A comparison of clinical and immunologic features in children and older patients hospitalized with severe cholera in Bangladesh. Pediatr. Infect. Dis. J. 2008; 27(11):986–92.
34. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Molecul. Biol. Rev. 1998; 62:1301–14.
35. Goel A.K., Tamrakar A.K., Kamboj D.V., Singh L. Direct immunofluorescence assay for rapid environmental detection of *Vibrio cholerae* O1. Folia Microbiol. (Praha). 2005; 50(5):448–52.
36. Hasan J.A., Huq A., Nair G.B., Garg S., Mukhopadhyay A.K., Loomis L. et al. Development and testing of monoclonal an-

- tibody-based rapid immunodiagnostic test kits for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:2935–9.
37. Ho J.A., Wu L.C., Huang M.R., Lin Y.J., Baeumner A.J., Durst R.A. Application of ganglioside-sensitized liposomes in a flow injection immunoanalytical system for the determination of cholera toxin. *Anal. Chem.* 2007; 79(1):246–50.
38. Jayasekera C.R., Harris J.B., Bhuiyan S., Chowdhury F., Khan A.I., Faruque A.S. et al. Cholera toxin-specific memory B cell responses are induced in patients with dehydrating diarrhea caused by *Vibrio cholerae* O1. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(7):1055–61.
39. Jonson G., Osek J., Svennerholm A.-M., Holmgren J. Immune mechanisms and protective antigens of *Vibrio cholerae* O139 as a basis for vaccine development. *Infect. Immun.* 1996; 64:3778–85.
40. Jyoung J.Y., Hong S., Lee W., Choi J.W. Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance. *Siosens. Bioelectron.* 2006; 21(12):2315–9.
41. Kallury P., Naheed A., Rahman S., Ansaruzzaman M., Faruque A.S., Bird M. et al. Evaluation if three rapid diagnostic test for cholera: does the skill level of the technician matter? *Trop. Med. Int. Health.* 2006; 11(1):49–55.
42. Kaper J.B., Morris J.G., Levine M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8:48–86.
43. Martinez-Govea A., Ambrosio J., Gutierrez-Cogco L., Flisser A. Identification and strain differentiation of *Vibrio cholerae* by using polyclonal antibodies against outer membrane proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8:768–71.
44. Mousavi S.L., Nazarian S., Amani J., Rahgerdi A.K. Rapid screening of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from south Iran by PCR-ELISA. *Iran Biomed. J.* 2008; 12(1):15–21.
45. Nato F., Boutonnier A., Rajerison M., Grosjean P., Dartevelle S., Guenole A. et al. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(3):476–8.
46. Qadri F., Azim T., Chowdhury A., Hossain J., Sack R.B., Albert M.J. Production, characterization and application of monoclonal antibodies to *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Clin. Diagn. Immunol.* 1994; 1:51–4.
47. Qadri F., Hasan J.A., Hossain J., Chowdhury A., Begum Y.A., Azim T. et al. Evaluation of the monoclonal antibody-based kit Bengal SMART for rapid detection of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal in stool samples. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:732–34.
48. Qadri F., Wennerås C., Albert M.J., Hossain J., Mannoor K., Begum Y. et al. Comparison of immune responses in patients infected with *Vibrio cholerae* O139 and O1. *Infect. Immun.* 1997; 65:3571–6.
49. Rahman M., Sack D.A., Wadood A., Yasmin M., Latif A. Rapid identification of *Vibrio cholerae* serotype O1 from primary isolation plates by a coagglutination test. *J. Med. Microbiol.* 1989; 28:39–41.
50. Rao V.K., Sharma M.K., Goel A.K., Singh L., Sekhar K. Amperometric immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using disposable screen-printed electrodes. *Anal. Sci.* 2006; 22(9):1207–11.
51. Rhie G.E., Jung H.M., Kim B.S., Mekalanos J.J. Construction of a *Vibrio cholerae* prototype vaccine strain O395-N1-E1 which accumulates cell-associated cholera toxin B subunit. *Vaccine.* 2008; 26(43):5443–8.
52. Shimada T., Arakawa E., Itoh K., Nakazato T., Okitsu T., Yamai S. et al. Two strains of *Vibrio cholerae* non-O1 possessing somatic (O) antigen factors in common with *V. cholerae* serogroup O139 synonym «Bengal». *Curr. Microbiol.* 1994; 29:331–3.
53. Tuteja U., Kumar S., Shukla J., Kingston J., Batra H.V. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56(Pt 10):1340–5.
54. Wang X.Y., Ansaruzzaman M., Vaz R., Mondlane C., Lucas M.E., von Seidlein L. et al. Field evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for the diagnosis of cholera in a high-risk population. *BMC Infect. Dis.* 2006; 6:17.
55. Yang J.S., Kim H.J., Yun C.H., Kang S.S., Im J., Kim H.S., Han S.H. A semi-automated vibriocidal assay for improved measurement of cholera vaccine-induced immune responses. *J. Microbiol. Methods.* 2007; 71(2):141–6.

N.E.Tereshkina, E.A.Mikheeva, Z.L.Devdariani, A.K.Adamov,
G.V.Grigoryeva

Immunodiagnosics of Cholera: Current State of the Problem

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Presented is the survey of the national and foreign literature concerning the questions of improvement of cholera immunodiagnosics. Considered are the problems and prospects of development of different preparations designed for cholera vibrios detection and serologic diagnostics of the disease.

Key words: cholera, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio cholerae* O139, immunodiagnosics, serologic diagnostics, immunodiagnostic preparations

Об авторах:

Терешкина Н.Е., Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Адамов А.К., Григорьева Г.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Tereshkina N.E., Mikheeva E.A., Devdariani Z.L., Adamov A.K., Grigoryeva G.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 25.06.09.