

УДК 616.932:579

## ВЫЯВЛЕНИЕ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕТОДОМ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИПСТИКОВ

© 2022 г. А. В. Бойко<sup>1</sup>, \*, Е. А. Михеева<sup>1</sup>, Т. Л. Захарова<sup>1</sup>, Н. А. Осина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФКУЗ “Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Саратов, 410005 Россия

\*e-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила в редакцию 29.04.2022 г.

После доработки 31.05.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

Разработан безынструментальный протокол выявления способности *Vibrio cholerae* к образованию токсина. В основе лежит метод дот-иммуоферментного анализа (дот-ИФА), реализованный на дипстиках. Для изготовления дипстиков требуется в 100 раз меньше моноклональных антител, чем в микропланшетном формате ИФА.

**Ключевые слова:** дот-иммуоанализ, дипстик, холерный токсин, *Vibrio cholerae*

**DOI:** 10.56304/S0234275822030012

Сохраняющаяся нестабильность ситуации по холере, обусловленная широким распространением этой инфекции в мире и сочетающаяся с риском завоза ее в нашу страну, требует пристального внимания, направленного на разработку методов лабораторного обеспечения противоэпидемических мероприятий. Одним из важных направлений в реализации этой задачи является оценка эпидемической значимости выделенных штаммов холерных вибрионов.

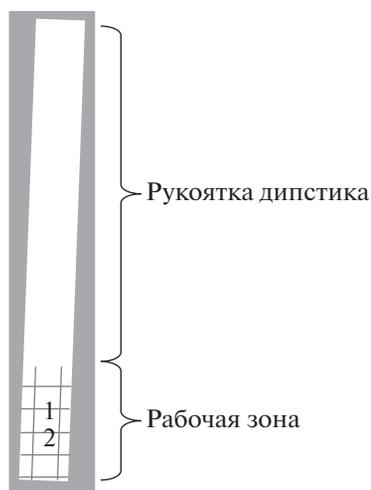
В соответствии с методическими указаниями по лабораторной диагностике холеры (МУК 4.2.2218-07 “Лабораторная диагностика холеры”) для оценки эпидемической значимости *Vibrio cholerae* серогрупп O1 и O139 предусмотрено определение гемолитической активности по Грейгу в совокупности с чувствительностью к холерным диагностическим бактериофагам  $ctx^+$  и  $ctx^-$ , выявление с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) генов *ctxAB* и *tcpA*, отвечающих за синтез холерного токсина и большой субъединицы токсинкорректируемых пилей адгезии соответственно, а для определения токсигенности вибрионов – модель кроликов-сосунков [1].

Заметим, что, во-первых, наличие гена далеко не всегда означает его полноценную экспрессию (это связано с механизмами регуляции и их возможными нарушениями); во-вторых, использо-

вание биомодели – это длительный и трудоемкий путь; в-третьих, фагорезистентность холерных вибрионов имеет тенденцию к росту. С учетом этих факторов проблему эпидемиологической значимости *V. cholerae* решают путем прямого обнаружения холерного токсина (ХТ), используя для этого иммуохимические методы: иммуоферментный анализ (ИФА) и латекс-агглютинацию [2, 3]. Рекомендованный Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) протокол ELISA-GM1 требует для проведения анализа использования дорогостоящих реагентов [4], а латексный диагностический VET-RPLA kit (Oxoid Limited, Великобритания) недостаточно специфичен, так как реагирует с энтеротоксигенными штаммами *Escherichia coli* [5].

Ранее получен положительный опыт по разработке иммуоферментной тест-системы для детекции ХТ, продуцируемого штаммами *V. cholerae* классического и El Tor биоваров [6, 7]. В ее основе лежал сэндвич-вариант ИФА, где в качестве твердой подложки использовали полистирольный планшет, лунки которого были сенсibilизированы моноклональными антителами 3E5, специфичными к ХТ [8]. Для выявления образовавшегося комплекса антитело–антиген использовали моноклональные анти-ХТ-антитела 2E5 против холерного токсина [9], конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP). Порог чувствительности тест-системы для детекции ХТ составлял 0.1 нг/мл. Токсин определяли в среде культивирования исследуемого штамма, с энтеротоксигенными штаммами

**Список сокращений:** ИФА – иммуоферментный анализ, ХТ – холерный токсин, моноАТ – моноклональные антитела, ФСБ – фосфатно-солевой буфер.



**Рис. 1.** Внешний вид дипстика и схема нанесения холерного токсина и моноклональных антител к нему. Рабочая зона дипстика: 1 – участок нанесения ХТ (внутренний положительный контроль), 2 – участок нанесения анти-ХТ-моноАТ.

**Fig. 1.** The appearance of the dipstick and the scheme of application of cholera toxin (CT) and monoclonal antibodies to it. The working area of the dipstick: 1 – CT application site (internal positive control), 2 – anti-CT-monoclonal antibody (MAb) application site.

*E. coli* кросс-реактивности не зарегистрировано. Однако время анализа было длительным (18–19 ч) и для его проведения требовалось специализированное оборудование.

Для упрощения исследований, в том числе в полевых условиях, сокращения их продолжительности и себестоимости представляется перспективным использование технологии дот-иммуноанализа и иных вариантов ИФА. Так, М.Г. Раррас и др. [10] использовали для проведения ИФА нитроцеллюлозные диски, помещенные в лунки планшетов, предназначенных для микротитрования. Подобная схема мембранной технологии была успешно применена при конструировании тест-системы для определения антител к *Yersinia pseudotuberculosis* [11]. Разработана тест-система для выявления антител к возбудителям кори, краснухи и паротита, в которой в качестве твердой фазы выбрана синтетическая бумага [12]. У. Nilofar и соавт. [13] для выявления антител к вирусу болезни Ньюкасла использовали дипстики, представляющие собой полоску из полистирола, к которой прикреплен материал, сенсibilизованный вирусным антигеном.

Целью проведенной нами работы была разработка безынструментального метода определения способности штаммов *V. cholerae* к синтезу ХТ на основе дот-ИФА с использованием дипстиков.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Материалы и методы

Для изготовления дипстика использовали следующие реагенты: бычий сывороточный альбумин (БСА), Tween-20 (Amresco, США), глицерин (Panreac, Испания), нитроцеллюлозную мембрану с сеткой с размером пор 0.2 мкм («Владисарт», Россия); синтетическую бумагу Polyolith марки GH-1 с плотностью 340 г/м<sup>2</sup> (Granwell, США), холерный токсин с концентрацией 1 мкг/мл (получен из штамма *Vibrio cholerae* 569В в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Россия).

Для сенсibilизации рабочей поверхности дипстика использовали специфичные к ХТ моноклональные антитела (моноАТ) 3Е5 [8], а для детекции – специфичные к ХТ анти-ХТ-моноАТ 2Е5 [9]. Последние конъюгировали с HRP (AppliChen, Германия) по методу М. Wilson & Р. Nakane [14]. В качестве субстрата для дот-иммуноанализа использовали 3,3'-диаминобензидин (ДАБ) (Sigma, США).

На полоске синтетической бумаги, плотностью 340 г/м<sup>2</sup> (например, Polyolith марки GH-1) и размером 70 × 5 мм, с одного края с помощью клея фиксировали полоску нитроцеллюлозной мембраны размером 12 × 3 мм с сеткой и размером пор 0.2 мкм (рис. 1). На прикрепленной мембране и проходит дот-иммуноанализ. На один из участков (№ 2 на рис. 1) мембраны наносили анти-ХТ-моноАТ 3Е5 (с концентрацией 20 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), рН 7.0) в объеме 1 мкл, а на другой (№ 1 на рис. 1) – ХТ (с концентрацией 80 мкг/мл в ФСБ, рН 7.0) в объеме 1 мкл. ХТ использовали как внутренний положительный контроль на каждом дипстике.

После нанесения антител и ХТ дипстик высушивали в течение 30 мин при температуре 37°C. Свободные участки связывания в рабочей зоне дипстика блокировали 2%-ным раствором БСА в ФСБ (рН 7.0), содержащем 0.05% Tween-20, в течение 2 ч при комнатной температуре. Дипстик промывали ФСБ (рН 7.2) путем ополаскивания рабочей зоны, высушивали при комнатной температуре и хранили до использования.

### Дот-ИФА с использованием дипстиков

Дот-иммуноанализ проводили по следующей схеме. В пробирку, содержащую бульон АК1 (бактериальный питательный бульон – 1.5%, дрожжевой экстракт – 0.4%, натрия бикарбонат – 0.3%, натрия хлорид – 0.5%) с подращенной культурой изучаемого штамма *V. cholerae*, помещали приготовленный дипстик и инкубировали при комнатной температуре 45 мин таким образом, чтобы рабочая зона была полностью погружена в среду. Затем, удерживая дипстик за рукоятку, промывали его ФСБ (рН 7.2) путем ополаскивания.

**Таблица 1.** Интерпретация результатов дот-иммуноанализа на дипстике  
**Table 1.** Interpretation of the results of dot-immunoassay on dipstics

Рабочая зона дипстика*		Интерпретация результата
1 – внутренний положительный контроль	2 – образец	
+	+	ХТ обнаружен в пробе
+	–	ХТ не обнаружен в пробе
–	–/+	Результат невалидный, необходимо дополнительное исследование

\* *Примечание:* “+” – положительный результат (наличие цветного пятна), “–” – отрицательный результат (отсутствие цветного пятна).

\**Note:* “+” – positive result (presence of a color spot), “–” – negative result (absence of a color spot).

Далее дипстик на 45 мин помещали в раствор моноАТ 2Е5, меченных пероксидазой хрена, в ФСБ (рН 7.0) на 45 мин. (Конъюгацию антител проводили по методу М. Wilson & Р. Nakane [14] *ex tempore*). Дипстик вновь промывали, как указано выше, и помещали в раствор субстрата до появления цветных пятен в рабочей зоне (обычно 3–5 мин). Субстрат готовили по прописи: 3 мл ФСБ + 1.5 мг ДАБ + 1.5 мкл 33%-ного раствора Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Дипстик сразу промывали, высушивали и регистрировали результат. Учет результатов возможен и до высушивания дипстика.

#### Определение чувствительности дот-ИФА с использованием дипстика

Подготовленные дипстики помещали в растворы ХТ разной концентрации: от 1 до 128 нг/мл – и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Дипстики промывали в ФСБ (рН 7.2), помещали на 45 мин в конъюгат моноАТ 2Е5-HRP и вновь промывали, как указано выше, затем инкубировали в растворе субстрата-хромогена (приготовлен *ex tempore*) до появления цветных пятен в рабочей зоне. Далее все процедуры проводили так, как описано выше.

#### Выявление холерного токсина методом ИФА

Для проведения классического варианта ИФА использовали “Тест-систему иммуоферментную для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)” производства ФКУЗ РосНИПЧИ “Микроб” [15]. Работу выполняли в соответствии с инструкцией по применению.

Для проведения исследования использовали 9 штаммов холерных вибрионов, из них два (569В

и М-41) относятся к *V. cholerae* серогруппы О1 классического биовара (*ctxAB*<sup>+</sup>, *tcpA*<sup>+</sup>); четыре (М-879, М-1509, М-1463 и Р-3122) – к *V. cholerae* серогруппы О1 биовара El Tor (*ctxAB*<sup>+</sup>, *tcpA*<sup>+</sup>), два (М-1460 и М-1436) – к *V. cholerae* серогруппы О1 биовара El Tor (*ctxAB*<sup>–</sup>, *tcpA*<sup>–</sup>), один (МО-45) – к *V. cholerae* серогруппы О139 (*ctxAB*<sup>+</sup>, *tcpA*<sup>+</sup>). Все штаммы были получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ “Микроб” Роспотребнадзора.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе проведенной нами работы был разработан дизайн дипстика и способ его изготовления (см. в разделе “Условия эксперимента”).

На следующем этапе провели оптимизацию способа выявления ХТ на сконструированных дипстиках. Ранее был предложен способ индукции ХТ в малых объемах бульона АК1 [5], который предусматривает следующие фазы: первичное подращивание исследуемого штамма *V. cholerae* (1/2 бактериологической петли № 2) в стеклянной пробирке, содержащей 10 мл среды АК1, при температуре 37°C в течение 2.5 ч; вторичное подращивание – путем пересева 1 мл подращенной на первом этапе культуры в центрифужную пробирку с 5 мл бульона АК1, которую располагают в термостате в наклонном положении (без касания жидкостью крышки пробирки) и инкубируют при температуре 37°C в течение 16 ч.

В результате ряда проведенных экспериментов подтверждена эффективность применения такого подхода индукции ХТ для использования в разработанном дот-иммуноанализе на дипстиках. Для выявления ХТ в культуральной жидкости предложен следующий алгоритм: подготовлен-



**Рис. 2.** Выявление холерного токсина с помощью дипстиков методом дот-иммуноанализа. ХТ присутствует (a) или отсутствует (b) в пробе.  
**Fig. 2.** Detection of cholera toxin using dipsticks by dot-immunoassay. CT is present (a) or absent (b) in the sample.

ный дипстик помещали в пробирку со средой АКІ с ростом исследуемого штамма; инкубировали при комнатной температуре в течение 45 мин. Дипстик промывали в ФСБ (рН 7.2); помещали в раствор НRP-меченых антител, инкубировали и отмывали, как указано выше. Для выявления образовавшихся комплексов антиген–антитело дипстик помещали в раствор субстрата и выдерживали в течение 3–5 мин до появления пятен в рабочей зоне, промывали путем ополаскивания и высушивали.

При наличии ХТ в бульоне АКІ в рабочей зоне дипстика появлялись два цветных пятна, хорошо контрастирующих с фоном. Наличие в рабочей зоне дипстика только одного верхнего пятна свидетельствует об отсутствии у тестируемого штамма *V. cholerae* способности к синтезу ХТ (рис. 2). Алгоритм регистрации результатов приведен в табл. 1.

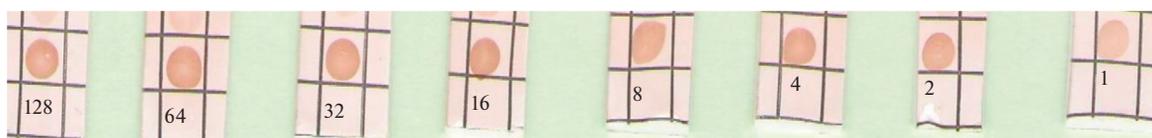
В ходе ряда экспериментов установлено, что аналитическая чувствительность разработанного способа детекции ХТ методом дот-иммуноанализа с использованием дипстика составила не менее 1 нг/мл. Из результатов, приведенных на рис. 3, видно, что ХТ в концентрации 1 нг/мл (предельно использованная минимальная концентрация) хорошо выявляется. Все зоны мембраны, на которую не нанесены анти-ХТ-антитела и собственно ХТ, представляют собой отрицательный контроль.

Дальнейшее определение чувствительности не проводили в связи с особенностями использования дипстиков (выращивание исследуемых штаммов в среде АКІ, обеспечивающей избыточную индукцию ХТ). Специфичность метода составила 100%, так как положительный результат регистрировали только при исследовании токсигенных штаммов *V. cholerae* (табл. 2).

Далее мы рассмотрели вопрос возможности сокращения продолжительности предложенного методического подхода. Показано, что на этапе индукции ХТ (вторичное подращивание) может быть реализовано прикрепление токсина к зоне 2 дипстика, где иммобилизованы моноАТ, специфично связывающие ХТ. В этом случае сразу после посева исследуемого материала для вторичного подращивания в пробирку помещали подготовленный к анализу дипстик и проводили культивирование вместе с ним. Такая схема позволяет сократить время исследования на 45 мин (приблизительно в 2 раза) без отрицательного влияния на конечный результат (рис. 4).

Как видно из результатов, приведенных на рис. 4, предложенный способ, как по полной, так и по сокращенной схеме, обеспечивает выявление ХТ, индуцированного токсигенными штаммами *V. cholerae* серогруппы O1 классического биовара, геновариантами биовара El Tor и серогруппы O139.

В ходе изучения токсигенных и нетоксигенных штаммов холерных вибрионов с помощью разработанного дот-иммуноанализа с использованием дипстиков и тест-системы ИФАХолХТ-М показано полное совпадение как положительных,

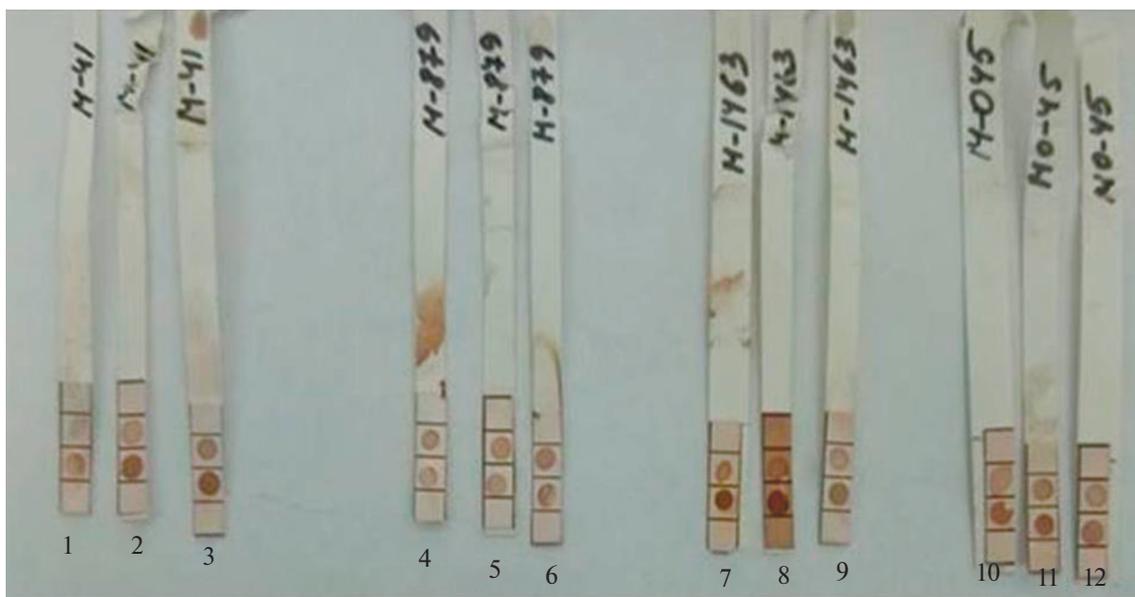


**Рис. 3.** Определение чувствительности дот-иммуноанализа с использованием дипстиков. Цифрами указана концентрация холерного токсина в нг/мл.  
**Fig. 3.** Determination of the sensitivity of dot-immunoassay with a use of dipsticks. The numbers indicate the concentration of cholera toxin in ng/mL.

**Таблица 2.** Сравнение эффективности дот-иммуноанализа с использованием дипстиков и коммерческой тест-системы ИФАХолХТ-М (ФКУЗ РoСНИПЧИ “Микроб”)

**Table 2.** Comparison of the effectiveness of dot-immunoassay with dipsticks and the commercial ELISACHolCT-M test system (Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”)

№ п/п	Штамм	Геногруппа	Выявление ХТ	
			ИФАХолХТ-М	дот-ИФА с дипстиками
<i>Vibrio cholerae</i> серогруппы O1 классического биовара				
1	569B	<i>ctxAB</i> <sup>+</sup> ; <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	+	+
2	М-41	<i>ctxAB</i> <sup>+</sup> ; <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	+	+
<i>Vibrio cholerae</i> серогруппы O1 биовара El Tor				
3	Р-3122	<i>ctxAB</i> <sup>+</sup> ; <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	+	+
4	М-879	<i>ctxAB</i> <sup>+</sup> ; <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	+	+
5	М-1509	<i>ctxAB</i> <sup>+</sup> ; <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	+	+
6	М-1463	<i>ctxAB</i> <sup>+</sup> ; <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	+	+
7	М-1436	<i>ctxAB</i> <sup>-</sup> ; <i>tcpA</i> <sup>-</sup>	-	-
8	М-1460	<i>ctxAB</i> <sup>-</sup> ; <i>tcpA</i> <sup>-</sup>	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> серогруппы O139				
9	МО-45	<i>ctxAB</i> <sup>+</sup> ; <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	+	+



**Рис. 4.** Результаты выявления холерного токсина на дипстиках методом дот-иммуноанализа. По полной схеме исследованы штаммы *Vibrio cholerae* М-41 (1), М-879 (4), МО-45 (10); по сокращенной схеме – *V. cholerae* М-41 (2, 3), М-879 (5, 6), М-1463 (7–9), МО-45 (11, 12).

**Fig. 4.** Results of detection of cholera toxin on dipsticks by dot-immunoassay. *Vibrio cholerae* strains М-41 (1), М-879 (4), МО-45 (10) were tested according to the full scheme; *V. cholerae* М-41 (2, 3), М-879 (5, 6), М-1463 (7–9), МО-45 (11, 12) were tested according to the shortcut scheme.

так и отрицательных результатов, полученных обоими методами, при анализе штаммов патогенов, соответственно продуцирующих и не продуцирующих ХТ (табл. 2).

Оценивая экономическую эффективность дот-иммуноанализа на дипстиках, следует отметить, что при изготовлении тест-системы ИФАХолХТ-М для сенсibilизации одной лунки полистиролового планшета требуется 100 мкл раствора специфических моноАТ с концентрацией 20 мкг/мл, в то время как для изготовления одного дипстика требуется 1 мкл раствора этих же антител в той же концентрации, то есть в 100 раз меньше на один анализ, и, следовательно, затраты на антитела снижаются в 100 раз.

Таким образом, нами разработан способ безынструментального выявления продуцируемого штаммами *Vibrio cholerae* токсина. Метод основан на принципе дот-иммуноанализа, проводимого на дипстиках. Экспериментально показано, что использование дипстиков для детекции холерного токсина не уступает по эффективности традиционному ИФА на иммунологических планшетах, позволяет сократить время анализа приблизительно в 2 раза и существенно снизить себестоимость исследования и его трудоемкость.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лабораторная диагностика холеры. Методические указания (МК 4.2.2218-07). Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007, 87 с.
2. Белая Ю.А., Гайлонская И.Н., Быстрова С.М., Ферантонтов Г.К. Определение холерного энтеротоксина с помощью реакции коагутинации. *Вестник Академии медицинских наук СССР*, 1984, 10, 69–73.
3. Almeida R.J., Hickman-Brenner F.W., Sowers E.G., Puhr N.D., Farmer J.J., 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. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.1.128-130.1990>
4. Ramamury T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine*, 2020, 38(Suppl. 1), A73–A82. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.099>
5. Detection of Cholera Toxin. In: Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*. chapter 7. Centers for Disease Control and Prevention, 2021, 63–88. <https://www.cdc.gov/cholera/pdf/laboratory-methods-for-the-diagnosis-of-vibrio-cholerae-chapter-7.pdf>
6. Михеева Е.А., Осина Н.А., Девдариани З.Л., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Способ и набор для определения продукции холерного токсина и дифференциации эпидемически значимых штаммов холерных вибрионов классического и эльтор биоваров. Патент RU 2611359, опубликован 21.02.2017. <https://patents.google.com/patent/RU2611359C1/ru>
7. Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Осина Н.А., Щербакова С.А. Определение холерного токсина у штаммов *V. cholera* в иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител. *Биозащита и биобезопасность*, 2014, 6(4), 38–42.
8. Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Осина Н.А. Штамм гибридных культивированных клеток животных *mus musculus* хт 3е5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 2а к в-субъединице холерного токсина. Патент RU 2590587, опубликован 10.07.2016.
9. Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Осина Н.А. Штамм гибридных культивированных клеток животных *mus musculus* хт 2е5 – продуцент моноклональных антител изотипа G1 к в-субъединице холерного токсина. Патент RU 2583306, опубликован 10.05.2016.
10. Pappas M.G., Hajkowski R., Cannon L.T.Sr., Hockmeyer W.T. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): comparison with standard ELISA and complement fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, 1984, 14(3–4), 239–249. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(84\)90094-3](https://doi.org/10.1016/0304-4017(84)90094-3)
11. Андрюков Б.Г., Тимченко Н.Ф., Раев М.Б. Конструирование неферментной тест-системы для безынструментального определения антител к *Yersinia pseudotuberculosis* на основе конъюгированных наночастиц углерода в формате иммуномембранных технологий и возможности ее применения в клинической практике. *Вестник Российской военной медицинской академии*, 2012, 4(40), 148–151.
12. Ериш А.В. Разработка диагностического набора для выявления антител к возбудителям кори, краснухи и эпидемического паротита методом мультиплексного дот-анализа. Дисс. ...канд. биол. наук, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора (Кольцово), п.г.т. Кольцово, 2015, 154 с.
13. Nilofar Y., Siddhartha N.J., Pradip K.D., Palas D., Arkendu H., Sk. Sahanawaz A. Seromonitoring of Newcastle disease in backyard poultry by indigenously developed user-friendly tool: Dipstick ELISA. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 2014, 2(3S), 16–18. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2014/2.3s.16.18>
14. Wilson M.B. Nakane P.K. Resent development in the periodate method of coniugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*, 1978, 215–244.
15. Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М) по ТУ 9388-052-01898109-2015. Регистрационное удостоверение на медицинское изделие от 15 ноября 2016 года № РЗН 2016/5013. <https://nevacert.ru/reestr/med-reestr/rzn-2016-5013-11215>.

## Detection of Cholera Toxin in the Culture Medium by dot-Immunoassay on Dipsticks

A. V. Boyko<sup>a, #</sup>, E. A. Mikheeva<sup>a</sup>, T. L. Zakharova<sup>a</sup>, and N. A. Osina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>FSHI Institution Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being, Saratov, 410005 Russia

<sup>#</sup>e-mail: rusrapi@microbe.ru

**Abstract**—An instrument-free method for detecting the toxin-producing ability of *Vibrio cholerae* has been developed. It is based on dot-ELISA implemented on dipsticks. For the manufacture of dipsticks, 100 times less monoclonal antibodies are required than in microplate ELISA format.

**Keywords:** dot-immunoanalysis, dipstick, cholera toxin, *Vibrio cholerae*

Свидетельство о регистрации средства массовой информации  
 ПИ № ФС77-75946 от 13 июня 2019 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,  
 информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

---

Подписано к печати 19.07.2022 г.	Формат 60 × 88 <sup>1</sup> / <sub>8</sub>	Усл. печ. л. 15.16	Уч.-изд. л. 15.50
Тираж 117 экз.	Зак. 5362	Цена договорная	

---

Учредители: Федеральное государственное бюджетное учреждение  
 «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

---

Издатель: НИЦ "Курчатовский институт", 123182, Россия, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1  
 Изготовитель оригинал-макета ООО "ТЕМАТИЧЕСКАЯ РЕДАКЦИЯ",  
 125252, г. Москва, ул. Зорге, д. 19, этаж 3, помещ. VI, комн. 44  
 Отпечатано в типографии «Book Jet» (ИП Коняхин А.В.),  
 390005, г. Рязань, ул. Пушкина, 18, тел. (4912) 466-151