

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-26-30

УДК 616.932:615.371

Н.И. Белякова, Л.Ф. Ливанова, О.В. Громова, О.С. Дуракова, О.Д. Клокова, К.И. Холматов,
М.В. Антонычева, З.Л. Девдариани, О.А. Волох

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ СУХОГО ГИДРОЛИЗАТА КАЗЕИНА В ПРОИЗВОДСТВЕ ХОЛЕРНОЙ БИВАЛЕНТНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель работы – подбор стандартной основы, содержащей сухой гидролизат казеина, для приготовления питательной среды, используемой в производстве вакцины холерной бивалентной химической при глубинном культивировании штаммов холерного вибриона в биореакторах. **Материалы и методы.** В работе использованы штаммы *Vibrio cholerae* O1 классического биовара: 569В серовара Инаба и М-41 серовара Огава. В исследование взяты две сухие основы среды: ферментативный гидролизат казеина Тип I Himedia (Индия) и панкреатический гидролизат казеина ГНЦ ПМБ (Россия). В качестве контроля использована среда лабораторного приготовления РосНИПЧИ «Микроб». Глубинное культивирование проводилось в биореакторах в течение (9 ± 1) ч с аэрацией и автоматической подкормкой глюкозой и аммиаком. Продукцию протективных антигенов определяли иммунохимическими и биологическими методами. **Результаты и обсуждение.** Показано, что глубинное культивирование производственных штаммов холерного вибриона на питательных средах, приготовленных на всех взятых в исследование основах, обеспечивает синтез протективных антигенов, показатели которых соответствуют требованиям нормативной документации. Более стандартные и высокие показатели целевого продукта обеспечивают культивирование штаммов-продуцентов на питательной среде с основой из сухого ферментативного гидролизата казеина, содержащей $(1,5\pm 0,1)$ г/л аминного азота для штамма *V. cholerae* М-41 и $(2\pm 0,1)$ г/л аминного азота для штамма *V. cholerae* 569В. Переход на использование стандартных сухих белковых компонентов сред культивирования не снижает качества вакцины холерной химической, но позволяет снизить ее себестоимость и сократить продолжительность технологического процесса.

Ключевые слова: *V. cholerae*, вакцина, питательная среда, глубинное культивирование, протективные антигены.

Корреспондирующий автор: Белякова Нина Ивановна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Белякова Н.И., Ливанова Л.Ф., Громова О.В., Дуракова О.С., Клокова О.Д., Холматов К.И., Антонычева М.В., Девдариани З.Л., Волох О.А. Использование питательной среды на основе сухого гидролизата казеина в производстве холерной бивалентной химической вакцины. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:26–30. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-26-30

N.I. Belyakova, L.F. Livanova, O.V. Gromova, O.S. Durakova, O.D. Klokova, K.I. KholmatoV,
M.V. Antonycheva, Z.L. Devdariani, O.A. Volokh

Usage of Nutrient Medium Based on Dry Hydrolysate of Casein in Manufacturing Bivalent Chemical Cholera Vaccine

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to select the standardized substrate containing dry hydrolysate of casein for preparation of nutrient medium utilized for manufacturing bivalent chemical cholera vaccine under submerged cultivation of cholera vibrio strains in fermenters. **Materials and methods.** We used *Vibrio cholerae* O1 strains of classical biovar: strain 569B Inaba and strain M-41 Ogawa. Examined were two dry substrates of the medium: enzymatic hydrolysate of casein, Type I Himedia (India) and pancreatic hydrolysate of casein, produced by the State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology (Russian Federation). Produced under laboratory conditions at the premises of the RusRAPI “Microbe” medium was used as a control. Submerged cultivation was conducted in bioreactors during (9 ± 1) h with aeration and automatic feeding of glucose and ammonia. Production of protective antigens was measured applying immunochemical and biological methods. **Results and discussion.** It is demonstrated that submerged cultivation of cholera vibrio production strains on nutrient media under study provides for synthesis of protective antigens the parameters of which comply with the requirements of normative documentation. More standardized and higher indicator values of the target product are ensured by cultivation of producer strains on nutrient medium with a substrate from dry enzymatic hydrolysate of casein, containing (1.5 ± 0.1) g/l of amino nitrogen for the strain *V. cholerae* M-41 and (2 ± 0.1) g/l – for *V. cholerae* 569 B. Transition to the use of standardized dry protein components of cultivation media does not lower the quality of the chemical cholera vaccine, but allows for the reduction of cost price and duration of technological process.

Key words: *V. cholerae*, vaccine, nutrient medium, submerged cultivation, protective antigens.

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

Corresponding author: Nina I. Belyakova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Belyakova N.I., Livanova L.F., Gromova O.V., Durakova O.S., Klokov O.D., Kholmatov K.I., Antonycheva M.V., Devdariani Z.L., Volokh O.A. Usage of Nutrient Medium Based on Dry Hydrolysate of Casein in Manufacturing Bivalent Chemical Cholera Vaccine. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:26–30. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-26-30
Received 19.08.19. Accepted 28.10.19.

На сегодняшний день холера остается одной из важных проблем здравоохранения. В мире ежегодно регистрируется от 1,3 до 2,9 млн случаев заболевания холерой, из которых до 95 тыс. заканчиваются смертью больного [1–3]. Одним из эффективных методов борьбы с холерой является применение оральных холерных вакцин. В настоящее время в мире лицензированы шесть оральных вакцин, обеспечивающих иммунную защиту от холеры [4]. В Российской Федерации зарегистрирована «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые, кишечнорастворимой оболочкой», производства РосНИПЧИ «Микроб» (Россия) [5]. Протективные свойства данной вакцины обеспечиваются двумя активными компонентами: холероген-анатоксином и O1-антигеном [6–8]. Эффективность этой вакцины не уступает широко применяемой во всем мире оральной холерной вакцине Dukoral [4].

Компоненты вакцины холерной бивалентной химической получают из бульонных культур штаммов-продуцентов, выращенных методом глубинного культивирования в биореакторах [6, 7]. Поэтому оптимизация условий роста микробной популяции с целью увеличения синтеза O1-антигена и холерного токсина (ХТ), из которого посредством формоловой детоксикации получают холероген-анатоксин, остается актуальным направлением исследований.

Состав питательной среды играет важную роль в процессе получения антигенных компонентов вакцины, обеспечивающих ее протективные свойства. В настоящее время в процессе глубинного культивирования штаммов холерного вибриона (продуцентов компонентов вакцины холерной) используется питательная среда на основе панкреатического гидролизата казеина (ОРК – основной раствор казеина), приготовленного лабораторным способом. Холерный вибрион выращивают в условиях глубинного культивирования в бульоне из ОРК, содержащем ($2\pm 0,1$) г/л аминного азота, до 1 % пептона и имеющем рН ($8,0\pm 0,1$) [9]. Изготовление лабораторным способом жидкой основы для среды требует значительных материальных и временных затрат, к тому же гидролизат длительное время хранится при температуре (6 ± 2) °С, что приводит к накоплению меланинподобного пигмента.

Цель работы – подбор стандартной основы, содержащей сухой гидролизат казеина, для приготовления питательной среды, используемой в производстве вакцины холерной бивалентной химической при глубинном культивировании штаммов холерного вибриона в биореакторах.

Материалы и методы

В работе использованы производственные штаммы *V. cholerae* O1 классического биовара: штамм

569В серовара Инаба и штамм М-41 серовара Огава, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб».

Глубинное культивирование проводилось в биореакторах BioForsPilot 300 в течение (9 ± 1) ч с аэрацией и автоматической подкормкой глюкозой и аммиаком. Общий расход за цикл составлял в среднем (6 ± 2) л 40 % раствора глюкозы и ($0,7\pm 0,1$) л 10 % раствора аммиака [10].

Для анализа эффективности процесса в исследование взяты следующие среды на основе гидролизата казеина: жидкого основного раствора панкреатического гидролизата казеина лабораторного приготовления (ОРК), сухого ферментативного гидролизата казеина производства Himedia (ФГК), сухого панкреатического гидролизата казеина производства ГНЦ ПБМ Оболенск (ПГК). Все перечисленные среды имели рН ($8,0\pm 0,1$) и содержали NaCl – 0,5 %, Na_2HPO_4 – 0,06 %, пептон до 1 %. Содержание аминного азота в средах составляло:

1. Питательная среда на основе ОРК – аминный азот ($2\pm 0,1$) г/л;
2. Питательная среда на основе ПГК (ГНЦ ПБМ) – аминный азот ($1\pm 0,1$) г/л;
3. Питательная среда на основе ПГК (ГНЦ ПБМ) – аминный азот ($2\pm 0,1$) г/л;
4. Среда на основе ФГК Тип I Himedia – аминный азот ($2\pm 0,1$) г/л;
5. Среда на основе ФГК Тип I Himedia – аминный азот ($1\pm 0,1$) г/л;
6. Среда на основе ФГК Тип I Himedia – аминный азот ($1,5\pm 0,1$) г/л.

Конечную концентрацию микробных клеток в бульонной культуре определяли по отраслевому стандарту мутности (ОСО) бактериальных взвесей 42-28-85П (10 МЕ), эквивалентному $2,2\cdot 10^9$ м.к. для холерных вибрионов.

Для определения эффективности питательных сред по показателю специфической активности ХТ в работе использовали образцы фильтрата бульонной культуры *V. cholerae* 569В, для определения активности O-антигена использовали формализированные безмикробные центрифугаты бульонной культуры штаммов *V. cholerae* 569В и М-41. Подготовку всех образцов проводили согласно СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

Активность O-антигена в безмикробном центрифугате бульонной культуры производственных штаммов определяли по величине титра в стандартной реакции диффузной преципитации (РДП) с сывороткой диагностической холерной O1 адсорбированной сухой для реакции агглютинации в агаре Дифко (1 % агар Дифко в 0,9 % растворе натрия хлорида, содержащий 0,01 % мертиолята). За титр РДП принимали максимальное разведение препарата, дающее линию

преципитата с холерной О1-сывороткой.

Активность ХТ в фильтрах бульонной культуры штамма *V. cholerae* 569В определяли в реакции пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) и кожной пробе Крейга. Для постановки РПИГ использовали чашки Петри с синказным агаром. За титр реакции принимали минимальное разведение образца фильтра бульонной культуры, которое образовывало зону лизиса эритроцитов [11]. Определение активности ХТ по методу Крейга проводили на взрослых кроликах и выражали в минимальной кожной дозе, которая вызывала образование папул (5–10) мм в диаметре [12].

Результаты и обсуждение

Проведен сравнительный анализ эффективности питательных сред, содержащих жидкую (лабораторного приготовления) или сухую основу с разным содержанием аминного азота, по показателям количества биомассы и специфической активности целевых продуктов (ХТ и О-антиген), полученных из бульонных культур штаммов холерного вибриона, выращенных методом глубинного культивирования.

В процессе культивирования на всех взятых в анализ питательных средах поддерживали одинаковые условия культивирования, разработанные для производственных штаммов *V. cholerae*: поддержание величины рН на уровне (7,5±0,5) в течение первых восьми часов роста и (8,0±0,3) в течение последних двух часов; использование 40 % раствора глюкозы и 10 % раствора аммиака [10]. Первые часы роста культивирование проводили при температуре (36±0,5) °С. Для штамма *V. cholerae* М-41 этот режим сохраняли до конца роста, для штамма *V. cholerae* 569В начиная с 5 ч роста температуру снижали до (33±1,0) °С.

Для сравнения результатов, полученных при выращивании штаммов *V. cholerae* М-41 и 569В на питательных средах с разной основой и отличающихся содержанием аминного азота, учитывали:

- конечную концентрацию микробных клеток в культуре;

- величину титра в стандартной реакции диффузионной преципитации (РДП) с О1-сывороткой.

Кроме того, для сравнения результатов, полученных при выращивании штамма *V. cholerae* 569В на разных питательных средах учитывали:

- максимальное разведение образца фильтра бульонной биореакторной культуры, которое образовывало зону лизиса эритроцитов в РПИГ;

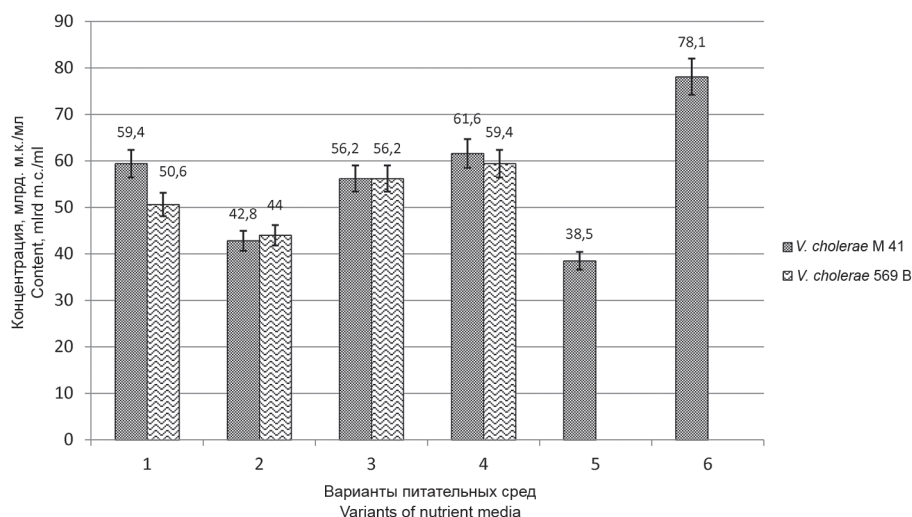
- минимальную кожную дозу фильтра бульонной культуры, которая вызывала образование папул от 5 до 10 мм в диаметре в пробе Крейга.

Анализ полученных результатов показал (рисунок), что конечная концентрация микробных клеток в бульонных культурах, выращенных на всех представленных питательных средах, была не менее (35,0±0,5) млрд м.к./мл. При культивировании штамма *V. cholerae* М-41 данный показатель был выше при использовании среды ФГК Тип I, с содержанием аминного азота (1,5±0,1) г/л. При культивировании штамма *V. cholerae* 569В на аналогичной среде самым высоким этот показатель был при содержании аминного азота (2±0,1) г/л. Снижение аминного азота до (1±0,1) г/л приводило к уменьшению выхода биомассы на (30±1) % для штамма *V. cholerae* М-41 и на (20±1) % для штамма *V. cholerae* 569В.

Показатель содержания О1-антигена в жидких фракциях Огава и Инаба при использовании в процессе культивирования перечисленных выше питательных сред также соответствовал требованиям нормативной документации (реципрокный титр в РДП не ниже 4). При использовании традиционной среды (основа ОРК лабораторного приготовления) данный показатель колебался от 8 до 32 во фракции Огава и стабильно составлял 8 во фракции Инаба (таблица).

При культивировании на среде с основой ФГК Тип I показатель специфической активности О1-антигена по результатам РДП во фракции Огава составлял от 4 до 16 (реципрокный титр), во фракции Инаба – 8.

При культивировании на среде с основой ПГК, содержащей (1±0,1) и (2±0,1) г/л аминного азота, данный показатель активности О1-антигена коле-



Сравнительная характеристика эффективности питательных сред на основе гидролизатов казеина при глубинном культивировании штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В:

Варианты питательных сред: 1 – на основе ОРК; 2, 3 – на основе ПГК; 4, 5, 6 – на основе ФГК тип I. Содержание аминного азота (г/л): 1, 3, 4 – по (2±0,1); 2, 5 – (1±0,1); 6 – (1,5±0,1)

Comparative characteristics of efficiency of casein hydrolysate-based nutrient media under submerged cultivation of *V. cholerae* М-41 and *V. cholerae* 569 В strains:

Variants of nutrient media: 1 – basic solution of casein; 2, 3 – based on pancreatic hydrolysate of casein; 4, 5, 6 – based on enzymatic hydrolysate of casein type I. Content of amino nitrogen (g/l): 1, 3, 4 – (2±0.1); 2, 5 – (1±0.1); 6 – (1.5±0.1)

Сравнительная характеристика эффективности питательных сред с разной основой по выходу целевого продукта
 Comparative characteristics of efficiency of nutrient media with different basis by the target product yield

| Среда культивирования на основе гидролизата казеина Cultivation medium based on casein hydrolysate | Содержание О-антигена Огава в жидкой фракции (обратный титр в РДП) Content of O-antigen Ogawa in liquid fraction (reverse titer in diffusion precipitation reaction) | Содержание О-антигена Инаба в жидкой фракции (обратный титр в РДП) Content of O-antigen Inaba in liquid fraction (reverse titer in diffusion precipitation reaction) | Активность холерного токсина Cholera toxin activity | |
|--|---|---|---|--|
| | | | РПИГ (обратный титр) passive immune hemolysis test (reverse titer) | реакция Крейга (тыс.) Craig's test (thous.) |
| ОРК, аминный азот (2±0,1) г/л Basic solution of casein, amino nitrogen (2±0,1) g/l | 8–32 | 8 | 8–256 | 16–128 |
| ФГК Тип I, аминный азот (1±0,1) г/л Enzymatic hydrolysate of casein type I, amino nitrogen (1±0,1) g/l | 4–8 | 8 | 32–256 | 24–256 |
| ФГК Тип I, аминный азот (1,5±0,1) г/л Enzymatic hydrolysate of casein type I, amino nitrogen (1.5±0,1) g/l | 16 | не определяли not measured | не определяли not measured | не определяли not measured |
| ФГК Тип I, аминный азот (2±0,1) г/л Enzymatic hydrolysate of casein type I, amino nitrogen (2±0,1) g/l | 16 | не определяли not measured | не определяли not measured | не определяли not measured |
| ПГК ГНЦ ПБМ, аминный азот (1±0,1) г/л Pancreatic hydrolysate of casein (State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology), amino nitrogen (1±0,1) g/l | 12–32 | 4–8 | 8–16 | 16–32 |
| ПГК, ГНЦ ПБМ, аминный азот (2±0,1) г/л Pancreatic hydrolysate of casein (State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology), amino nitrogen (2±0,1) g/l | 12–32 | 4–8 | 8–16 | 32 |

бался от 12 до 32 во фракции Огава и от 8 до 16 во фракции Инаба.

Величина титра жидкой фракции Инаба в реакции пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) также соответствовала требованиям нормативной документации (обратный титр не ниже 8) при использовании всех взятых в исследование питательных сред: от 8 до 256 на среде с ОРК, от 32 до 256 на среде с основой ФГК Тип I (Himedia) и от 8 до 16 на среде с ПГК (ГНЦ ПБМ). Активность фильтратов бульонных культур штамма *V. cholerae* 569В (ХТ), выращенных на питательных средах, также показала соответствие требованиям нормативной документации (не ниже 2 тыс. единиц) и составила: от 16 тыс. до 128 тыс. на среде с ОРК лабораторного приготовления, от 24 тыс. до 256 тыс. на среде ФГК Тип I (Himedia), от 16 тыс. до 32 тыс. на среде с ПГК (ГНЦ ПБМ), содержащей (1±0,1) г/л аминного азота, и 32 тыс. на среде ПГК (ГНЦ ПБМ), содержащей (2±0,1) г/л аминного азота.

Конечный выход протективных антигенов при выделении их из бульонных культур холерного вибриона, полученных при культивировании на питательных средах, приготовленных на основе гидролизата казеина разных производителей, свидетельствует о целесообразности использования стандартных сухих основ. Так, вес сухой фракции Огава, полученной при культивировании на среде с ФГК Тип I (Himedia), содержащей (1±0,1) г/л аминного азота, в 2 раза превысил вес аналогичной фракции, полученной при культивировании на среде с ОРК, со-

держащей (2±0,1) г/л аминного азота: (735,0±25,0) и (366,0±142,5) г. Для фракции Инаба этот показатель соответственно составил (644,0±44,5) г при культивировании на среде с ФГК Тип I (Himedia), содержащей (1±0,1) г/л аминного азота, и (250,0±136,0) г при культивировании на среде с ОРК, содержащей (2±0,1) г/л аминного азота.

Таким образом, сравнительный анализ показателей количества и активности протективных антигенов, полученных из бульонных культур штаммов холерного вибриона, выращенных методом глубокого культивирования на питательных средах с основой из гидролизата казеина разных производителей показал, что все взятые в исследование среды соответствуют требованиям нормативной документации и могут использоваться в производстве вакцины холерной бивалентной химической. Вместе с тем, более стандартные и высокие показатели целевого продукта обеспечивает культивирование штаммов-продуцентов на питательной среде на основе сухого ферментативного гидролизата казеина, содержащей (1,5±0,1) г/л аминного азота для штамма *V. cholerae* М-41 и (2±0,1) г/л аминного азота для штамма *V. cholerae* 569В, что предполагает преимущественное использование данной среды в производственных целях.

Переход на использование стандартных сухих белковых компонентов сред культивирования позволит снизить себестоимость серий вакцины холерной бивалентной химической и сократить время в процессе ее производства.

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

Список литературы

1. Ali M., Nelson A.R., Lopez A.L., Sack D.A. Updated global burden of cholera in endemic countries. *PloSNegl. Trop. Dis.* 2015; 9(6):e0003832. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003832.
2. World Health Organization. Cholera, 2015. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2016; 91(38):433–40.
3. World Health Organization. Cholera, 2017. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2018; 93(38):489–500.
4. Горяев А.А., Саяпина Л.В., Обухов Ю.И., Бондарев В.П. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики холеры. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2018; 18(1):42–9. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-42-49.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. Москва; 2018. Т. 1–4.
6. Анисимов П.И., Адамов А.К., Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.П. Способ производства вакцины для профилактики холеры. Патент РФ № 2080121, опубл. 27.05.1997 г.
7. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.В. Оральная химическая вакцина из гипертоксиогенных штаммов KM76 Инаба и KM68 Огава возбудителя Холеры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1991; 68(4):31–6.
8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Щуковская Т.Н., Смирнова Н.И., Никифоров А.К., Еремин С.А., Топорков В.П. Специфическая профилактика холеры в современных условиях. *Проблемы особо опасных инфекций,* 2011; 1:5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-5-12.
9. Еремин С.А., Алешина Ю.А., Комиссаров А.В., Громова О.В., Васин Ю.Г., Никифоров А.К., Ливанова Л.Ф., Волох О.А., Лобовикова О.А., Бронникова В.С. Методы и технологии культивирования холерного вибриона (обзор). *Проблемы особо опасных инфекций.* 2013; 4:95–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-95-101.
10. Еремин С.А., Комиссаров А.В., Ливанова Л.Ф., Белякова Н.И., Волох О.А., Васин Ю.Г., Никифоров А.К. Повышение эффективности процесса культивирования производственных штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов протективных антигенов в производстве вакцины холерной химической таблетированной. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Ростов-н/Д: Доницдат; 2013. С. 241–3.
11. Шагинян И.А., Маракуша Б.М. Модификация метода пассивного иммунного гемолиза на плотной среде для выявления продукции термолabileльных энтеротоксинов штаммами холерных вибрионов и кишечной палочки. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1983; 60(2):92–6.
12. Craig J.P., Yamamoto K., Takeda Y., Miwatani T. Production of cholera-like toxin by *V. cholerae* non-O1 strains isolated from environment. *Infect. Immun.* 1981; 34(1):90–7. PMID: 7298194. PMID: PMC350825.

References

1. Ali M., Nelson A.R., Lopez A.L., Sack D.A. Updated global burden of cholera in endemic countries. *PloSNegl. Trop. Dis.* 2015; 9(6):e0003832. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003832.
2. World Health Organization. Cholera, 2015. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2016; 91(38):433–40.

3. World Health Organization. Cholera. 2017. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2018; 93(38):489–500.
4. Goryaev A.A., Sayapina L.V., Obukhov Yu.I., Bondarev V.P. [Efficiency and safety of the vaccines for cholera prophylaxis]. *BIOPreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie [BIOpreparations. Prophylaxis, Diagnostics, Treatment].* 2018; 18(1):42–9. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-42-49.
5. State Pharmacopeia of the Russian Federation, XIV edition. Moscow; 2018. Vol. 1–4.
6. Anisimov P.I., Adamov A.K., Dzharparidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.P. [Method for the production of the vaccine for cholera prophylaxis]. RF Patent No 2080121, published on May 27, 1997.
7. Dzharparidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.V. [Oral chemical vaccines from hyper-toxicogenic strains KM76 Inaba and KM68 Ogawa of cholera agent]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, Immunologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology].* 1991; 68(4):31–6.
8. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., Shchukovskaya T.N., Smirnova N.I., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Toporkov V.P. [Cholera Specific Prophylaxis in Modern Conditions]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2011; 1:5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-5-12.
9. Eremin S.A., Alechina Yu.A., Komissarov A.V., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Nikiforov A.K., Livanova L.F., Volokh O.A., Lobovikova O.A., Bronnikova V.S. [Methods and technologies of cholera vibrio cultivation (Scientific Review)]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2013; 4:95–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-95-101.
10. Eremin S.A., Komissarov A.V., Livanova L.F., Belyakova N.I., Volokh O.A., Vasin Yu.G., Nikiforov A.K. [Effectiveness enhancement of cultivation of *Vibrio cholerae* production strains – producers of protective antigens, in the process of manufacturing of tableted chemical cholera vaccine]. In: [Cholera and Pathogenic for Humans Vibrios]. Rostov-on-Don; 2013. P. 241–3.
11. Shaginyan I.A., Marakusha B.M. [Modification of passive immune hemolysis on solid medium for detection of thermo labile enterotoxin production by cholera vibrio and colibacillus strains]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, Immunologii. [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology].* 1983; 60(2):92–6.
12. Craig J.P., Yamamoto K., Takeda Y., Miwatani T. Production of cholera-like toxin by *V. cholerae* non-O1 strains isolated from environment. *Infect. Immun.* 1981; 34(1):90–7. PMID: 7298194. PMID: PMC350825.

Authors:

Belyakova N.I., Livanova L.F., Gromova O.V., Durakova O.S., Klokov O.D., Kholmatov K.I., Antonycheva M.V., Devdariani Z.L., Volokh O.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Белякова Н.И., Ливанова Л.Ф., Громова О.В., Дуракова О.С., Клокова О.Д., Холматов К.И., Антоньчева М.В., Девдариани З.Л., Волох О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 19.08.19.

Принята к публ. 28.10.19.