

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-70-74

УДК 616.932:579.222

О.С. Дуракова, С.А. Воробьева, А.В. Гаева, Я.М. Краснов, О.С. Кузнецов, П.С. Ерохин,
О.В. Громова, О.А. Волох**ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ СВОЙСТВ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* –
ПРОДУЦЕНТОВ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ**

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

Одним из ключевых требований к штаммам-продуцентам, используемым в производстве иммунобиологических препаратов, является их стабильность, которая заключается в сохранении основных культурально-морфологических, физиологических и продуктивных свойств в ряде генераций. В данной статье предложен комплексный методический подход для проверки стабильности штаммов методами *in vitro*. **Цель** исследования – провести комплексный анализ стабильности штаммов – продуцентов активных компонентов холерной химической вакцины при подготовке посевного материала и на этапе культивирования. **Материалы и методы.** В работе использовали токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* 569B классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* M-41 классического биовара серовара Огава. Морфологию клеток контролировали методами световой и электронной трансмиссивной микроскопии. С помощью атомно-силовой микроскопии измеряли основные параметры бактериальной клетки. Анализ штаммов на присутствие в хромосоме гена *ctxA* осуществляли с использованием тест-системы «ГенХол» с электрофоретическим учетом результатов. Полногеномное секвенирование штаммов проводили на платформе Ion Torrent PGM с использованием чипа Ion 318 Chip Kit и набора реагентов Ion PGM Hi-Q View Chef 400 Kit. Для определения специфической активности холерного токсина и О-антигена использовали ДОТ-иммуноанализ с конъюгатом на основе стафилококкового белка А и наночастиц коллоидного золота. **Результаты и обсуждение.** Микробиологическими, иммунохимическими, молекулярно-генетическими методами и методами микроскопического анализа на всех этапах культивирования подтверждена стабильность основных свойств производственных штаммов *V. cholerae* – продуцентов активных компонентов холерной химической вакцины и экспериментально обоснована перспективность использования комплексного методического подхода. Адаптация данных методов позволит контролировать стабильность штаммов-продуцентов, оптимизировать условия культивирования и, как следствие, увеличить выход необходимого антигенного компонента вакцины.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холерная химическая вакцина, стабильность штаммов-продуцентов, полногеномное секвенирование.

Корреспондирующий автор: Дуракова Оксана Сергеевна, e-mail: rusrapr@microbe.ru.

Для цитирования: Дуракова О.С., Воробьева С.А., Гаева А.В., Краснов Я.М., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Громова О.В., Волох О.А. Изучение стабильности свойств штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов активных компонентов холерной химической вакцины. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; 2:70–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-70-74

Поступила 29.03.2022. Отправлена на доработку 07.04.2022. Принята к публ. 22.04.2022.

O.S. Durakova, S.A. Vorob'eva, A.V. Gaeva, Ya.M. Krasnov, O.S. Kuznetsov, P.S. Erokhin,
O.V. Gromova, O.A. Volokh**Investigating the Stability of the Properties of *Vibrio cholerae* Strains –
Producers of Active Components of the Chemical Cholera Vaccine**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. One of the key requirements to producer strains used in the manufacturing of immunobiological preparations is their stability, which consists in maintaining the main cultural, morphological, physiological, and productive properties in a series of generations. This paper describes a comprehensive methodological approach to testing strain stability using *in vitro* techniques. **The purpose** of this study was to conduct an integrated analysis of the stability in the strains that produce active components of the chemical cholera vaccine when preparing seed material and at the stage of cultivation. **Materials and methods.** Toxigenic strains of *Vibrio cholerae* 569B of the classical biovar, serovar Inaba and *V. cholerae* M-41 of the classical biovar, serovar Ogawa were used in the work. Cell morphology was monitored through light and transmission electron microscopy. Atomic force microscopy was applied to measure the main parameters of the bacterial cell. The strains were tested for the presence of *ctxA* gene in the chromosome using the "GenChol" test system with electrophoretic registration of results. Whole genome sequencing of the strains was performed on the Ion Torrent PGM platform using the Ion 318 Chip Kit and the Ion PGM Hi-Q View Chef 400 Kit. To determine the specific activity of cholera toxin and O-antigen, a DOT immunoassay with a conjugate based on staphylococcal protein A and colloidal gold nanoparticles was applied. **Results and discussion.** The stability of the main properties of industrial *V. cholerae* strains – producers of the active components of the chemical cholera vaccine has been confirmed using microbiological, immunochemical, molecular-genetic methods and microscopic analysis at all stages of cultivation, and the prospects for using the integrated methodological approach experimentally substantiated. Tailoring of these methods will make it possible to control the stability of producer strains, optimize cultivation conditions and, as a result, increase the yield of the necessary antigenic component of the vaccine.

Key words: *Vibrio cholerae*, chemical cholera vaccine, stability of producer strains, whole genome sequencing.

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

Corresponding author: Oksana S. Durakova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Durakova O.S., Vorob'eva S.A., Gaeva A.V., Krasnov Ya.M., Kuznetsov O.S., Erokhin P.S., Gromova O.V., Volokh O.A. Investigating the Stability of the Properties of *Vibrio cholerae* Strains – Producers of Active Components of the Chemical Cholera Vaccine. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 2:70–74. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-70-74

Received 29.03.2022. *Revised* 07.04.2022. *Accepted* 22.04.2022.

Durakova O.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8823-3524>
Vorob'eva S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3624-0850>
Gaeva A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7395-9023>
Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

Kuznetsov O.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7048-5942>
Erokhin P.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9525-8327>
Gromova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0172-2964>
Volokh O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>

Использование холерных вакцин в качестве меры предотвращения возникновения эпидемий холеры является официальной стратегией Всемирной организации здравоохранения, которая рекомендует вакцинацию контингента с повышенным риском заражения [1–3]. В Российской Федерации вакцинация против холеры включена в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям (приказ Министерства здравоохранения РФ от 21.03.2014 № 125н с изменениями от 03.02.2021) и проводится препаратом для профилактики холеры – «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой» (PN 001465/01), которая с 2020 г. включена в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов.

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора является единственным в России производителем этого иммунобиологического лекарственного препарата, который выпускается в соответствии с промышленными регламентами на производство.

Штамм *Vibrio cholerae* 569В классического биовара является продуцентом холерного токсина (ХТ) и О-антигена (О-АГ) серовара Инаба, а *V. cholerae* М-41 классического биовара – продуцентом О-АГ серовара Огава. В соответствии с нормативной документацией регулярно проводится контроль свойств штаммов-продуцентов. Производственные штаммы должны быть типичными для S-формы по морфологическим, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам. Также штаммы должны обладать вирулентными, токсигенными и иммуногенными свойствами в опытах на лабораторных животных. Морфологию штаммов проверяют путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму; культуральные свойства изучают в посевах на жидкие и твердые питательные среды; подвижность определяют при посеве культуры петлей на агаре уколом; биохимические свойства проверяют путем посева на среды Гисса с 0,1 % углеводами; серологические свойства проверяют в реакции агглютинации; токсигенные свойства штамма *V. cholerae* 569В изучают на присутствие в хромосоме штамма гена *ctxA*.

Современные технологии (секвенирование полных геномов, ПЦР и т.д.) открывают новые возможности более тонких исследований молекулярно-генетической структуры штаммов – продуцентов

холерной вакцины. С помощью молекулярно-генетических методов можно определить появление мутаций и отследить стабильность генома в ряде генераций и в процессе культивирования в биореакторе. Благоприятные и неблагоприятные факторы окружающей среды могут привести к изменению поверхностных структур клетки. Методы атомно-силовой микроскопии (АСМ) и световой и электронной трансмиссивной микроскопии (ТЭМ) позволяют оценить морфологические и механические параметры бактерий [4]. Методом дот-иммуноанализа с золотыми наночастицами (ДИА-ЗНЧ) доказана возможность оценки активности антигенов с первого часа культивирования холерного вибриона [5].

Цель данного исследования – провести комплексный анализ стабильности штаммов – продуцентов активных компонентов холерной химической вакцины при подготовке посевного материала и на этапе культивирования.

Материалы и методы

В работе использовали токсигенные штаммы *V. cholerae* 569В классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* М-41 классического биовара серовара Огава, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Культивирование проводили согласно нормативной документации в производственных условиях. Контролировали характер роста на плотных и жидких питательных средах, концентрацию микробных клеток, специфическую активность протективных антигенов, наличие гена *ctxA*⁺, морфологию клеток в пробах бульонной культуры с I по III генерацию при подготовке посевного материала и с 1-го по 10-й час при выращивании в биореакторе.

Определение концентрации холерных вибрионов осуществляли по отраслевому стандартному образцу мутности бактериальных взвесей. Характер роста контролировали визуально. Морфологию клеток контролировали методами световой (окрашивание мазков по Граму) и электронной трансмиссивной (методом негативного контрастирования) микроскопии. С помощью атомно-силовой микроскопии (методами полуконтактным и рассогласования) измеряли основные морфометрические показатели бактериальной клетки: длину, ширину, высоту, а также параметры шероховатости поверхности клеточной стенки.

Исследования проводили на сканирующем зондовом микроскопе Solver P47 PRO (NT-MDT, Россия) с использованием кремниевых кантилеверов серии NSG01, обладающих резонансной частотой 120 кГц и константой жесткости 5,5 Н/м. Сканирование выполнялось в режиме прерывистого контакта следующими методами: полуконтактным и рассогласования. Обработку изображений проводили с помощью встроенного программного обеспечения Nova с указанием стандартных отклонений от среднего значения [6].

Анализ штаммов на присутствие в хромосоме гена *ctxA* проводили с использованием тест-системы для выявления ДНК *V. cholerae* (*ctxA*⁺) методом ПЦР («ГенХол») (РосНИПЧИ «Микроб»). Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1–2 % агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл этидия бромида. Полногеномное секвенирование штаммов *V. cholerae* 569В и М-41, отобранных на разных этапах культивирования, проводили на платформе Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием чипа Ion 318 Chip Kit и набора реагентов Ion PGM Hi-Q View Chef 400 Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Покрытие нуклеотидной последовательности генома, исследуемого на каждом из этапов культивирования штаммов, составило от $\times 54$ до $\times 102$. Сборку единичных прочтений (ридов) проводили с помощью программы Newbler 2.6 (Roche, Швейцария).

При определении специфической активности ХТ и О-АГ использовали ДОТ-иммуноанализ с конъюгатом на основе стафилококкового белка А и наночастиц коллоидного золота (ДИА-ЗНЧ) [7].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы Microsoft Office Excel, рассчитывая среднее арифметическое значение, среднее квадратичное отклонение и стандартную ошибку среднего.

Результаты и обсуждение

Процесс получения исходного сырья для выделения антигенов холерной вакцины имеет несколько стадий. Для получения культуры первой генерации мы брали 19-часовые колонии штаммов – продуцентов ХТ (*V. cholerae* 569В) и О-антигена

(*V. cholerae* М-41) на плотной питательной среде, II генерацией служили 6-часовые бульонные культуры, III генерацией – 17-часовая бульонная культура. IV генерацией являлась реакторная бульонная культура штаммов-продуцентов в конце выращивания (10-часовая).

Оба штамма на всех этапах культивирования по культуральным свойствам являлись типичными для S-формы, диссоциация не отмечалась. На поверхности плотного питательного агара холерный вибрион формировал крупные (2–3 мм), гладкие, прозрачные колонии с ровными краями, которые отсвечивали голубоватым цветом при косом освещении, а на жидких питательных средах – легкое помутнение и образование биопленки.

Методом световой микроскопии при окрашивании по Граму отмечена типичность формы бактерий во всех исследованных пробах (рис. 1).

Методом АСМ были изучены морфометрические показатели микробных клеток штаммов-продуцентов в процессе подготовки посевного материала и культивирования (I–IV генерации), результаты представлены в таблице.

Как видно из таблицы, морфометрические показатели микробных клеток штамма *V. cholerae* М-41 остаются практически неизменными в I–IV генерациях и составляют в среднем по следующим показателям: длина – $(2,05 \pm 0,1)$ мкм, ширина – $(0,64 \pm 0,05)$ мкм, высота – $(0,26 \pm 0,03)$ мкм. Для штамма *V. cholerae* 569В в процессе глубинного культивирования к 10-му часу клетки в среднем изменили свои линейные размеры в сторону увеличения длины (с $2,4 \pm 0,1$ до $3,51 \pm 0,2$ мкм). При этом высота (с $0,255 \pm 0,02$ мкм) и ширина (с $0,7 \pm 0,03$ мкм) в среднем не изменились. Шероховатость клеточной стенки у обоих штаммов оставалась практически неизменной, что свидетельствует о стабильной продукции антигенов.

Методом ТЭМ на всех этапах четко визуализировались типичные вибрионы. В условиях глубинного культивирования в реакторе и наличия оптимальных условий в среде выращивания (температура, pH, подкормка 40 % раствором глюкозы и аммиаком) к 10-му часу культивирования у клеток визуализировался жгутик (рис. 2).

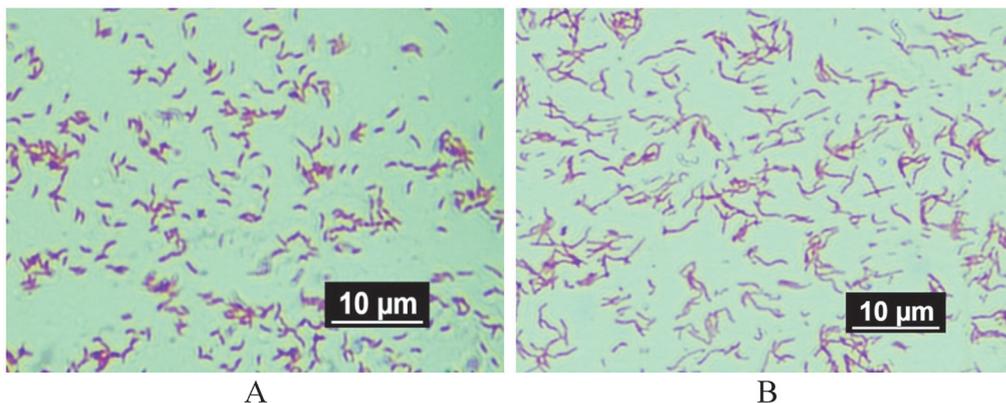


Рис. 1. Окрашивание по Граму мазков штаммов-продуцентов *V. cholerae* (10 ч культивирования):

A – штамм *V. cholerae* М-41;
B – штамм *V. cholerae* 569В

Fig. 1. Gram staining of smears of *V. cholerae*-producing strains (10 hours of cultivation):

A – *V. cholerae* M-41 strain;
B – *V. cholerae* 569B strain

Морфометрические показатели клеток
Morphometric parameters of cells

| Наименование штамма Strain | Длина, мкм Length, μm | Ширина, мкм Width, μm | Высота, мкм Height, μm | Шероховатость, R_q , нм Roughness, R_q , nm |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--|
| <i>V. cholerae</i> 569B, I генерация <i>V. cholerae</i> 569B, I generation | 2,4 \pm 0,2 | 0,59 \pm 0,05 | 0,26 \pm 0,02 | 24 \pm 1 |
| <i>V. cholerae</i> 569B, II генерация <i>V. cholerae</i> 569B, II generation | 3,11 \pm 0,1 | 0,81 \pm 0,08 | 0,25 \pm 0,02 | 25 \pm 1 |
| <i>V. cholerae</i> 569B, III генерация <i>V. cholerae</i> 569B, III generation | 2,3 \pm 0,1 | 0,8 \pm 0,07 | 0,24 \pm 0,02 | 23 \pm 1 |
| <i>V. cholerae</i> 569B, IV генерация <i>V. cholerae</i> 569B, IV generation | 3,51 \pm 0,2 | 0,52 \pm 0,02 | 0,15 \pm 0,02 | 20 \pm 1 |
| <i>V. cholerae</i> M-41, I генерация <i>V. cholerae</i> M-41, I generation | 1,7 \pm 0,1 | 0,62 \pm 0,03 | 0,24 \pm 0,02 | 22 \pm 1 |
| <i>V. cholerae</i> M-41, II генерация <i>V. cholerae</i> M-41, II generation | 2,3 \pm 0,15 | 0,56 \pm 0,03 | 0,29 \pm 0,03 | 21 \pm 1 |
| <i>V. cholerae</i> M-41, III генерация <i>V. cholerae</i> M-41, III generation | 2,3 \pm 0,1 | 0,67 \pm 0,02 | 0,28 \pm 0,02 | 19 \pm 1 |
| <i>V. cholerae</i> M-41, IV генерация <i>V. cholerae</i> M-41, IV generation | 1,9 \pm 0,1 | 0,71 \pm 0,05 | 0,26 \pm 0,03 | 17 \pm 1 |

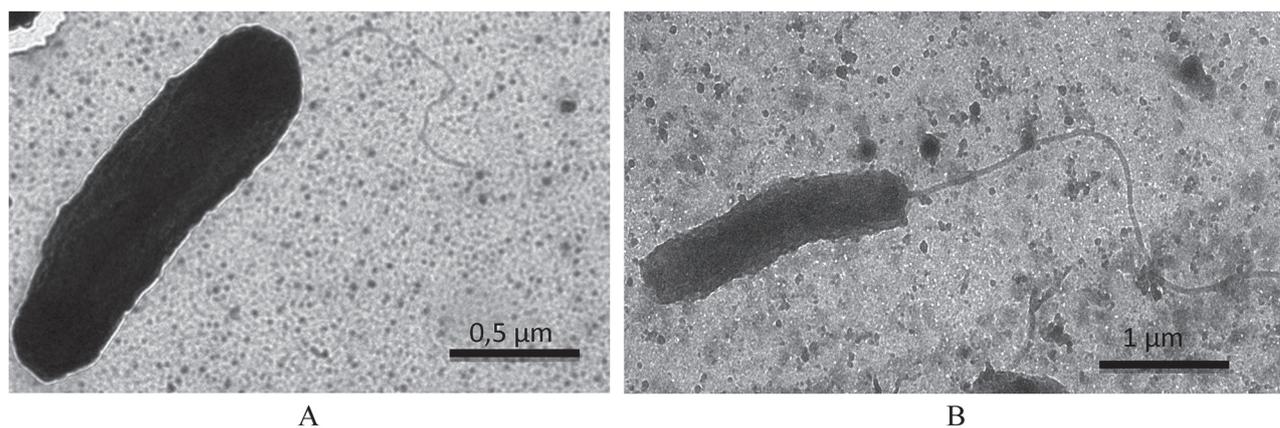


Рис. 2. Электронная микроскопия штамма *V. cholerae* при глубинном культивировании (10 ч):
A – M-41; B – 569B

Fig. 2. Electron microscopy images of the *V. cholerae* strain during submerged cultivation (10 h):
A – M-41; B – 569B

Для подтверждения наличия гена *ctxA*⁺ взяты пробы с I по III генерацию при подготовке посевного материала и на 5-й, 10-й часы выращивания обоих штаммов.

Как показано на рис. 3, во всех исследованных пробах были выявлены фрагменты ДНК, свидетельствующие о наличии полноценного гена *ctxA* (полоса 564 н.п.), что говорит о стабильности производственных штаммов по показателю «токсигенность».

Анализ результатов полногеномного секвенирования показал, что в процессе подготовки посевного материала (I и II генерации обоих штаммов) и после 10 часов культивирования в биореакторе структура генома исследованных штаммов полностью сохраняется. Таким образом, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей секвенированных образцов каждого штамма, отбираемых на разных

этапах культивирования, не выявил отличий от соответствующего исходного варианта.

Согласно данным ДИА-ЗНЧ, наличие активных компонентов детектировалось с 1-го часа для О-АГ и с 3-го часа для ХТ. Максимальная продукция антигенов наблюдалась в стационарной фазе роста (9–10-е часы от начала выращивания) у штаммов *V. cholerae* M-41 и 569B. В настоящее время ведется разработка молекулярно-генетических методов определения уровня экспрессии гена *ctxA*, ответственного за синтез основных иммуногенов *V. cholerae* при производстве холерной вакцины.

Таким образом, нами подтверждена стабильность основных свойств производственных штаммов-продуцентов комплексом микробиологических, иммунохимических, молекулярно-генетических методов и методов микроскопического анализа на

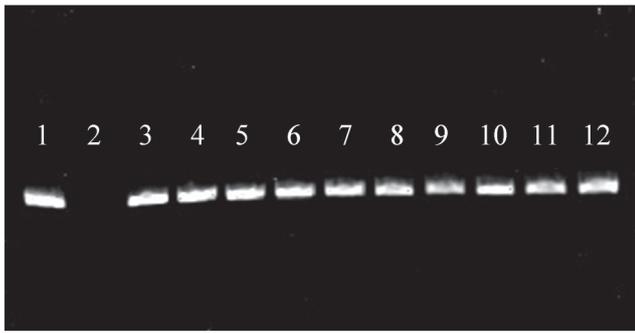


Рис. 3. Выявление участка гена *ctxA* в хромосоме штаммов-продуцентов с использованием тест-системы «ГенХол» методом ПЦР:

1 – положительный контроль; 2 – отрицательный контроль; 3–5 – генерации посевного материала штамма *V. cholerae* 569B; 6 – 5-й час выращивания штамма *V. cholerae* 569B; 7 – 10-й час выращивания штамма *V. cholerae* 569B; 8–10 – генерации посевного материала штамма *V. cholerae* M-41; 11 – 5-й час выращивания штамма *V. cholerae* M-41; 12 – 10-й час выращивания штамма *V. cholerae* M-41

Fig. 3. Detection of the *ctxA* gene region in the chromosome of producer strains using the “GenChol” test system through polymerase chain reaction:

1 – positive control; 2 – negative control; 3–5 – generations of inoculum of *V. cholerae* 569B strain; 6 – 5th hour of cultivation of *V. cholerae* 569B strain; 7 – 10th hour of cultivation of *V. cholerae* 569B strain; 8–10 – generations of inoculum of *V. cholerae* M-41 strain; 11 – 5th hour of cultivation of *V. cholerae* M-41 strain; 12 – 10th hour of cultivation of *V. cholerae* M-41 strain

всех этапах культивирования. Стабильность геномов штаммов опосредованно подтверждает стабильность производственных условий культивирования и качество производственного процесса. Полногеномное секвенирование дает исчерпывающую информацию о последовательности и структуре всего генома исследуемого штамма и может быть использовано как для подтверждения подлинности, так и для оценки стабильности исследуемого штамма.

Применение комплексного методологического подхода является перспективным для анализа стабильности штаммов – продуцентов протективных антигенов.

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

Список литературы

- ВОЗ: Холера. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cholera> (дата обращения 28.02.2022).
- Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербак С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 1:89–101.
- Борисевич И.В., Дармов И.В., редакторы. Руководство по вакцинопрофилактике особо опасных инфекций. Киров: Кировская областная типография; 2011. 152 с.
- Ерохин П.С., Уткин Д.В., Осина Н.А., Бойко А.В., Кузнецов О.С., Куклев В.Е., Бугоркова Т.В. Современное со-

стояние изучения ультраструктуры поверхности клеточной стенки микроорганизмов в условиях неблагоприятного воздействия факторов биотической и абиотической природы методами атомно-силовой микроскопии. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2016; 16(2):186–9. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-186-189.

5. Дуракова О.С., Громова О.В., Ливанова Л.Ф., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Гаева А.В., Киреев М.Н., Волох О.А. Современные подходы к выделению и очистке холерного токсина. *Бактериология*. 2018; 3(1):59–62. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-59-62.

6. Уткин Д.В., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Спицын А.Н., Волох О.А., Осина Н.А. Разработка методических подходов изучения возбудителей особо опасных инфекционных болезней методом атомно-силовой микроскопии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; 2:62–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-2(112)-62-64.

7. Дуракова О.С., Громова О.В., Киреев М.Н., Воробьева С.А., Клокова О.Д., Ливанова Л.Ф., Белякова Н.И., Волох О.А. Применение дот-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2018; 14(4):10–3.

References

- WHO: Cholera. (Cited 28 Feb 2022). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cholera>.
- Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Kutyrev V.V., Smirnova N.I., Shcherbakova S.A., Moskvitina E.A., Titova S.V. [Relevant problems of epidemiological surveillance, laboratory diagnostics and prevention of cholera in the Russian Federation]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2016; (1):89–101.
- Borisevich S.V., Darmov I.V., editors. [Guidelines on the Vaccine Prevention of Particularly Dangerous Infections]. Kirov: LLC “Kirov Regional Printing House”; 2011. 152 p.
- Erokhin P.S., Utkin D.V., Osina N.A., Boiko A.V., Kuznetsov O.S., Kulev V.E., Bugorkova T.V. [The current state of the study of the cell wall surface ultrastructure of microorganisms under the adverse effects of biotic and abiotic factors using atomic force microscopy]. *Izvestiya Saratovskogo Universiteta. Novaya Seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya [News of the Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology]*. 2016; 16(2):186–9. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-186-189.
- Durakova O.S., Gromova O.V., Livanova L.F., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Gaeva A.V., Kireev M.N., Volokh O.A. [Modern approaches to isolation and purification of cholera toxin]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2018; 3(1):59–62. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-59-62.
- Utkin D.V., Kuznetsov O.S., Erokhin P.S., Spitsyn A.N., Volokh O.A., Osina N.A. [Development of methodological approaches to the study of pathogens of particularly dangerous infectious diseases by atomic force microscopy]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2012; (2):62–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-2(112)-62-64.
- Durakova O.S., Gromova O.V., Kireev M.N., Vorob'eva S.A., Klokova O.D., Livanova L.F., Belyakova N.I., Volokh O.A. [The use of dot-immunoassay to determine the specific activity of antigens in the production of cholera vaccine]. *Vestnik Biokhologii i Fiziko-Khimicheskoi Biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova [Bulletin of Biotechnology and Physical-Chemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov]*. 2018; 14(4):10–3.

Authors:

Durakova O.S., Vorob'eva S.A., Gaeva A.V., Krasnov Ya.M., Kuznetsov O.S., Erokhin P.S., Gromova O.V., Volokh O.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Дуракова О.С., Воробьева С.А., Гаева А.В., Краснов Я.М., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Громова О.В., Волох О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.