

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-12-19

УДК 616.932:615.371

С.А. Воробьева, О.С. Дуракова, О.В. Громова, О.А. Волох, О.Д. Клокова, А.К. Никифоров

АНТИГЕННЫЕ КОМПОНЕНТЫ ХОЛЕРНОЙ БИВАЛЕНТНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ, МЕТОДЫ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ И КОНТРОЛЯ

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

В статье представлен обзор данных по методам выделения и контроля антигенов *Vibrio cholerae* холероген-анатоксина и О-антигенов Инаба и Огава – компонентов пероральной холерной бивалентной химической вакцины производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», единственного профилактического препарата против холеры, зарегистрированного на территории Российской Федерации. В настоящий момент в производстве вакцины используется способ раздельного получения холероген-анатоксина и О-антигенов Инаба и Огава с поэтапным контролем их основных свойств, который обеспечивает получение качественного готового препарата. Эффективным методом концентрирования полуфабриката, который способствует сокращению потерь и увеличению выхода конечного продукта, является ультрафильтрация. Перспективной остается разработка метода щадящей стерилизации О-антигенов для максимального сохранения специфической активности. Для контроля специфической активности антигенных компонентов и готового препарата вакцины применяют комплекс методов *in vivo* и *in vitro*. Однако многостадийность и длительность, применение нескольких видов лабораторных животных, а также современные требования ВОЗ определяют необходимость внедрения альтернативных методов контроля *in vitro*. В качестве замены биологического метода перспективным является использование клеточных культур, для которого показана положительная корреляция с тестами на животных. Для оценки активности антигенов предлагается применение иммунохимического метода – дот-иммуноанализа с золотыми наночастицами, что позволит унифицировать способ контроля на всех этапах производственного процесса, а также проводить определение серовароспецифичности О-антигенов холерного вибриона. Разработка молекулярно-генетических, микробиологических, иммунохимических методов актуальна для более полного и всестороннего контроля основных иммуногенов производственных штаммов холерного вибриона. Внедрение перспективных методов получения антигенов и контроля их свойств позволит более полно охарактеризовать компонентный состав готовой лекарственной формы холерной химической вакцины.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, пероральная холерная вакцина, холерный токсин, холероген-анатоксин, О-антиген.

Корреспондирующий автор: Воробьева Светлана Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Воробьева С.А., Дуракова О.С., Громова О.В., Волох О.А., Клокова О.Д., Никифоров А.К. Антигенные компоненты холерной бивалентной химической вакцины, методы их выделения и контроля. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 2:12–19. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-12-19

Поступила 01.12.2021. Принята к публ. 17.01.2022.

S.A. Vorob'eva, O.S. Durakova, O.V. Gromova, O.A. Volokh, O.D. Klokova, A.K. Nikiforov

Antigenic Components of Chemical Bivalent Cholera Vaccine, Methods of Their Isolation and Control

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

Abstract. The paper presents a review of the data on the methods of isolation and control of *Vibrio cholerae* antigens – cholero-gen-anatoxin and O-antigens of Inaba and Ogawa – components of the oral bivalent chemical cholera vaccine produced by the RusRAPI "Microbe", the only prophylactic drug against cholera registered in the territory of the Russian Federation. Currently, the vaccine is produced using the method of segregated manufacturing of cholero-gen-anatoxin and O-antigens Inaba and Ogawa with step-by-step control of their main properties, which ensures the production of a high-quality finished product. Ultrafiltration is an effective method for concentrating a semi-finished product, which helps to reduce losses and increases the yield of the final product. It remains promising to develop a method for gentle sterilization of O-antigens to maximize the preservation of specific activity. To control the specific activity of the antigenic components and the finished vaccine preparation, a complex of *in vivo* and *in vitro* methods is applied. However, the multi-stage process and duration, the use of several types of laboratory animals, as well as modern WHO requirements determine the need for the introduction of alternative *in vitro* control methods. The use of cell cultures as a replacement for the biological method appears prospective, and demonstrates a positive correlation with animal tests. To assess the activity of antigens, the use of an immunochemical method – dot-immunoassay with gold nanoparticles – is put forward, which will make it possible to harmonize the control method at all stages of the production process, as well as to determine the serovar specificity of *Vibrio cholerae* O-antigens. The development of molecular-genetic, microbiological, immunochemical methods is relevant for a more complete and comprehensive control of the main immunogens of industrial strains of cholera vibrio. The introduction of promising methods for obtaining antigens and monitoring their properties will allow for a more complete characterization of the component composition of the finished dosage form of the chemical cholera vaccine.

Key words: *Vibrio cholerae*, oral cholera vaccine, cholera toxin, cholero-gen-anatoxin, O-antigen.

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

Corresponding author: Svetlana A. Vorob'eva, e-mail: rusrapl@microbe.ru.

Citation: Vorob'eva S.A., Durakova O.S., Gromova O.V., Volokh O.A., Klokov O.D., Nikiforov A.K. Antigenic Components of Chemical Bivalent Cholera Vaccine, Methods of Their Isolation and Control. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 2:12–19. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-12-19

Received 01.12.2021. *Accepted* 17.01.2022.

Vorob'eva S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3624-0850>
Durakova O.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-8823-3524>
Gromova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0172-2964>

Volokh O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>
Klokov O.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7119-0516>
Nikiforov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1130-3504>

На сегодняшний день холера остается одной из основных проблем мирового здравоохранения, затрагивающих в основном страны Азии, Африки и Америки. Возбудителями холеры являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* серогрупп O1 и O139. По-прежнему актуальна угроза выноса инфекции из эндемичных стран и возникновения заносных эпидемических очагов, что требует постоянной готовности к экстренному проведению мероприятий по локализации и ликвидации очагов холеры. В Российской Федерации неблагоприятный прогноз по холере обусловлен потенциальными рисками завоза болезни, связанными с посещением стран, неблагополучных по холере. Решающую роль в профилактике холеры играет многосторонний подход, заключающийся в сочетании санитарно-гигиенических мероприятий, специфической профилактики и информирования общественности [1]. Официальная стратегия ВОЗ предполагает использование холерных вакцин в качестве дополнительных мер предотвращения возникновения эпидемий холеры вне эндемичных территорий и рекомендует их применение для вакцинации контингентов с повышенным риском заражения (население лагерей беженцев, лица без определенного места жительства и т.д.), а также путешественников и туристов [2].

В настоящее время за рубежом существует три преквалифицированные ВОЗ пероральные вакцины против холеры: Dukoral (Швеция), Shanchol (Индия) и Euvichol (Корея). Dukoral является цельноклеточной вакциной, обогащенной рекомбинантной В-субъединицей холерного энтеротоксина. Она состоит из инактивированных формалином или нагреванием клеток *V. cholerae* O1 группы обоих биоваров (classical и El Tor) и сероваров (Инаба и Огава) и В-субъединицы холерного токсина [3, 4]. Вакцина Dukoral рекомендована для взрослых и детей с двух лет. Вакцинация пероральная двухэтапная проводится с интервалом 1–6 недель. Форма выпуска – суспензия во флаконах с саше, содержащим гранулы буфера. Бивалентные вакцины Shanchol и Euvichol состоят из инактивированных нагреванием или формалином клеток *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 [5]. Данные вакцины представляют собой готовую суспензию для перорального применения по двукратной схеме с 10–14-дневным интервалом. Рекомендованы для взрослых и детей от одного года. Вакцина Shanchol реализуется во флаконах, а Euvichol – во флаконах и пластиковой тубе.

В Российской Федерации зарегистрирована и выпускается вакцина холерная бивалентная химиче-

ская производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Ее специфическими компонентами являются: холероген-анатоксин (ХА) и О-антигены (О-АГ), полученные из инактивированных формалином бульонных культур *V. cholerae* O1 классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* серовара Огава [6]. Вакцина представляет собой таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой. Рекомендована для взрослых и детей с двух лет. В отличие от перечисленных выше препаратов, вакцинацию проводят перорально однократно. В 1992 г. холерная бивалентная химическая вакцина прошла государственные испытания [1] и серийно выпускается с 1995 г. В настоящее время она является единственным профилактическим препаратом против холеры, зарегистрированным на территории Российской Федерации. Холерная бивалентная химическая вакцина включена в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям (приказ Минздрава России от 21.03.2014 № 125н (ред. от 03.02.2021) «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям») и входит в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. Отмечается, что российская холерная вакцина не уступает по эффективности зарубежным вакцинам [2, 7], кроме того, является уникальным по составу действующих веществ, форме выпуска и кратности иммунизации современным профилактическим препаратом против холеры.

Целью данной работы является обзор методических подходов, используемых в настоящее время и перспективных для внедрения на этапах выделения специфических антигенных компонентов холерной химической вакцины и контроля их основных свойств.

Методы выделения специфических компонентов вакцины. В настоящее время компоненты вакцины холерной бивалентной химической получают из бульонных культур штаммов *V. cholerae*, выращенных методом глубинного культивирования в биореакторах. Целевыми продуктами при выращивании штаммов-продуцентов являются холерный токсин, из которого посредством формоловой детоксикации получают холероген-анатоксин, и О-антигены сероваров Инаба и Огава. Продолжается поиск новых штаммов-гиперпродуцентов, для которых характерен высокий уровень продукции основных иммуногенов холерного вибриона [8, 9]. Следует отметить необходимость подбора параметров культивирования для получения увеличенного выхода антигенов.

Перспективным направлением является также разработка и внедрение малоотходных технологий [10].

Группа сотрудников института «Микроб» во главе с М.Н. Джапаридзе разработала способ получения ХА и О-АГ Инаба и Огава [11, 12]. Данные исследования легли в основу нормативной документации на производство вакцины холерной бивалентной химической таблетированной. В качестве основного сырья использовали безмикробный центрифугат культуральной жидкости, полученной в результате глубинного культивирования штаммов-продуцентов *V. cholerae* О1-серогруппы классического биовара. Детоксикацию проводили добавлением формалина для снижения токсичности О-АГ и образования устойчивого ХА. После чего приступали к выделению, очистке и концентрированию иммуногенов.

При разработке методов получения антигенов, входящих в состав вакцины, отталкивались от уже известных на тот момент способов, однако их недостатком являлось совместное выделение антигенов: термолабильного растворимого белка – холероген-анатоксина и термостабильного липополисахарида – О-антигена Инаба. Для решения данной проблемы, а также для уменьшения трудоемкости, экономии времени и средств был разработан способ отдельного получения ХА и соматического О-АГ Инаба. Антигены из культуральной жидкости выделяли последовательным фракционированием сернокислым аммонием. Осадок использовали для получения О-АГ Инаба, а из центрифугата проводили выделение ХА. После диализа и стерилизации жидкие препараты иммуногенов лиофильно высушивали и использовали для изготовления вакцины.

Выделение и очистку О-АГ Огава проводили осаждением сернокислым аммонием с последующим фракционированием. Однако получение О-АГ (Инаба и Огава) двукратным переводом из растворенного состояния в осадок при помощи сульфата аммония влияло на их нативную структуру и растворимость. Для решения данной проблемы, а также для повышения эффективности процессов концентрирования и очистки О-АГ была разработана масштабируемая технология концентрирования с использованием ультрафильтрационных модулей на полых волокнах. Предварительно из нативного раствора О-АГ удаляются балластные белки путем их осаждения при рН (4,4±0,2), затем проводится мембранная ультрафильтрация центрифугата на автоматизированной установке через полые волокна, пропускающая частицы с молекулярной массой менее 100 кДа, позволяющая очищать О-АГ от неспецифических примесей и одновременно концентрировать его в 20 раз. Путем гель-хроматографии на TSK-геле HW-60 (Toyo Soda MFG, Co LTD, Япония) раствор О-АГ отделяют от оставшихся высокомолекулярных неспецифических примесей с молекулярной массой менее 300 кДа [13]. Такая технология позволяет сохранять однофазное растворенное состояние О-АГ и получать нативный, очищенный, гомогенный и им-

муногенный препарат. Однако такой антиген использовался для специфической индикации и в диагностических целях, но не в качестве компонента вакцины. Еще одной разработкой на основе ультрафильтрации была технология получения О-АГ Огава, включающая этап концентрирования с использованием установки с модулями из полых волокон с номинальной отсечкой по молекулярной массе 17 кДа [14].

Описанные выше методы наряду с преимуществами имели и свои недостатки: большие потери выделяемых продуктов, низкую удельную скорость процесса. Двукратное осаждение сернокислым аммонием культуральной среды при получении ХА и О-АГ Инаба приводило к существенному расходу осадителя. Таким образом, для устранения всех недостатков необходимо было разработать эффективную технологию получения антигенных препаратов, входящих в состав холерной вакцины. А.В. Комиссаров с соавт. разработали способы концентрирования нативных антигенов холерного вибриона, выделяемых при культивировании производственных штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41, внедренные в процесс производства холерной бивалентной химической вакцины [15, 16]. Для увеличения выхода конечного продукта – ХА и О-АГ Инаба – из безмикробного центрифугата и уменьшения количества сернокислого аммония, требуемого для осаждения, было предложено проводить отделение балластных примесей через мембранные фильтры с номинальной отсечкой по молекулярной массе 50 кДа в режиме проточной фильтрации. Использование данной технологической операции позволяет снизить потери антигенов при их выделении в 1,2 раза, а необходимое количество сернокислого аммония сократить в 10 раз. Для увеличения выхода О-АГ Огава с сохранением его показателей качества и повышения удельной скорости фильтрации было предложено проводить концентрирование путем проточной фильтрации через мембранные модули с номинальной отсечкой по молекулярной массе 500 кДа. Данное внедрение позволило увеличить производительность процесса и снизить потери антигена с сохранением качества получаемого препарата.

Основные компоненты вакцины содержат в своем составе и другие сопутствующие биологически активные вещества [17]. Наряду с основными иммуногенами в среде выращивания обнаружен ряд ферментов, а также незначительное количество токсинорегулируемых пилей адгезии (ТКПА) [18]. ТКПА относятся к основным факторам патогенности и иммуногенности холерного вибриона и отвечают за развитие антиколонизирующего иммунитета. Однако их наличие не контролируется на этапах производства вакцины, что также отмечается и зарубежными коллегами, в частности при производстве вакцины Dukoral [19].

В процессе культивирования холерного вибриона обнаружено присутствие протеаз, фосфолипаз А и С, лизофосфолипаз, ДНК-аз и РНК-аз. Для

большинства из них характерно заметное снижение удельной активности к концу выращивания, однако активность протеаз, фосфолипаз А и С штамма *V. cholerae* М-41 повышалась вплоть до наступления стационарной фазы. Было установлено, что ферменты, содержащиеся в культуральной жидкости штамма *V. cholerae* М-41, осаждались из концентрата вместе с О-АГ при высаливании сернокислым аммонием, но их активность была ниже, чем при получении О-АГ без ультрафильтрации. Полученные данные свидетельствовали о содержании ряда ферментов в ультрафильтрате, который являлся отходом производства. Из ультрафильтрата традиционным способом высаливания сульфатом аммония был получен ферментный комплекс протеовибрин с высокой протеазной активностью [20]. При дальнейшем изучении содержания ферментов на этапах получения основных компонентов вакцины было выявлено, что при стерилизующей фильтрации ХА через мембранные фильтры сохранялась активность некоторых ферментов, тогда как при стерилизации О-АГ кипячением все ферменты инактивировались.

Разработки и исследования, проведенные ранее, способствовали развитию и совершенствованию методов получения компонентов, входящих в состав готового препарата. На современном этапе отобраны и адаптированы несколько технологий, которые позволяют получать качественные антигены и уменьшить затраты на дополнительное сырье для их выделения [11, 12, 15, 16]. В настоящий момент используется способ раздельного выделения ХА и О-АГ Инаба, который позволяет получать более специфичные препараты. Внедрен метод ультрафильтрации, применяемый для концентрирования и обессоливания антигенов, что способствует сокращению потерь и увеличению выхода конечного продукта, а также позволяет получать ферментный комплекс протеовибрин. Перспективной остается разработка метода щадящей стерилизации О-антигенов для максимального сохранения специфической активности.

Методы контроля специфической активности компонентов вакцины. Производство вакцин, как и других лекарственных препаратов, должно осуществляться в соответствии с Правилами надлежащей производственной практики (Good manufacturing practice). Контроль готовой лекарственной формы холерной химической вакцины проводится с помощью комплекса методов *in vivo* и *in vitro* в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации [21], а также нормативной документацией производителя.

Токсигенные свойства штамма продуцента *V. cholerae* 569В изучают молекулярно-генетическим (на присутствие в хромосоме гена *ctxA* с помощью тест-системы для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (*ctxA*⁺) методом полимеразной цепной реакции – ГенХол) и иммунохимическим (на способность продуцировать токсин во внешнюю среду в реакции пассивного иммунного гемолиза – РПИГ) метода-

ми. Контроль активности ХТ осуществляется биологическим (кожной пробой по Craig на кроликах) и иммунохимическими (с помощью РПИГ и реакции диффузионной преципитации (РДП) с антихолерогенной сывороткой) методами. Оценку активности О-АГ проводят иммунохимическим методом в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с использованием набора реагентов для определения содержания О-антигена в РНГА. Завершающая стадия изготовления вакцины – это контроль качества готового препарата по нормируемым физико-химическим, микробиологическим, иммунохимическим свойствам. Специфическую активность готовой лекарственной формы оценивают по содержанию О-АГ *V. cholerae* О1 (РНГА), по антигенной активности в реакции анатоксинсвязывания (ЕС на кроликах) и иммуногенности (на белых мышках).

Комплекс методов, применяемых на разных стадиях производственного цикла, позволяет получить активный, очищенный и качественный антиген, что в свою очередь гарантирует высокое качество готовой вакцины. Следует отметить, что на данном этапе актуальным вопросом остается совершенствование методов контроля компонентов вакцины, поскольку применяемые в настоящее время методы имеют ряд недостатков: многостадийность и длительность, применение нескольких видов лабораторных животных. Актуальными являются исследования, направленные на разработку и модификацию способов оценки активности основных иммуногенов холерного вибриона на разных стадиях производства. В качестве перспективных рассматриваются молекулярно-генетические, иммунохимические и методы с использованием клеточных культур. Сегодня вопросы этического, разумного и экономного использования животных в исследованиях в области медицины, биологии и ветеринарии привлекают все большее внимание специалистов и общественности. В 1959 г. У. Рассел и Р. Берч издали книгу «Принципы гуманной экспериментальной техники», в которой обоснована концепция гуманного использования животных в экспериментах, получившая название «Концепция трех R» [22]. На сегодняшний день данная концепция признана общепринятым стандартом, благодаря которому разрабатываются альтернативные методы исследования, что способствует сокращению количества используемых лабораторных животных.

Ранее была показана возможность использования перевиваемых клеточных культур для детекции ХТ [23]. Нами адаптирован метод оценки активности ХТ *in vitro* с использованием перевиваемой культуры овариальных клеток китайского хомячка (СНО-К1) [24] для контроля содержания ХТ на этапах производства холерной вакцины. Полученные результаты коррелируют с данными метода кожной пробы по Craig и РПИГ. Предлагаемый метод позволяет определить активность продукции токсина у штамма *V. cholerae* 569В при глубинном культивировании в биореакторе, а также специфическую актив-

ность холерогена-анатоксина по реакции анатоксинсвязывания с использованием клеточных культур.

Для определения активности ХТ широко апробированным является метод иммуоферментного анализа (ИФА, ELISA). При этом наибольшей чувствительностью отличаются методы, связанные с использованием ганглиозидов GM1, обладающих сродством к иммуногенной В-субъединице ХТ [25]. ИФА на основе моноклональных АТ, разработанный сотрудниками нашего института, позволяет проводить детекцию токсигенных штаммов [26], однако данные методы разрабатывались и использовались для диагностических целей. Нами была показана возможность оценки продукции ХТ штамма *V. cholerae* 569В при глубинном культивировании методом иммуоферментного анализа с использованием GM1-ганглиозидов (GM1-ELISA) [27], что позволяет определить активность ХТ без использования лабораторных животных и подобрать оптимальные условия культивирования для увеличенного синтеза антигена. Следует отметить, что данный метод перспективен для определения остаточной токсичности ХА [19].

К числу чувствительных иммунодиагностических тестов, с помощью которых возможна детекция антигенов, относится твердофазный иммуоферментный анализ и его дот-вариант на нитроцеллюлозной мембране. Дот-иммуоанализ (ДИА) является одним из наиболее эффективных и доступных методов, характеризуется высокой чувствительностью, простотой и быстротой выполнения. Для визуализации и учета результатов в качестве хромогенной метки применяют золотые наночастицы (ЗНЧ) [28, 29]. Нами была изучена возможность применения данного метода для оценки активности антигенов, входящих в состав холерной вакцины. Результаты показали положительную корреляцию активности ХТ, ХА и О-АГ Инаба и Огава в ДИА ЗНЧ с методами, используемыми в производстве [30, 31]. Отмечается перспектива его использования для оценки стабильности антигенных компонентов и готовой лекарственной формы в тестах на длительное и ускоренное старение, что позволит аргументировать увеличение их срока годности. Для определения активности серовароспецифичного О-АГ были подобраны условия постановки прямого варианта ДИА ЗНЧ, где в качестве конъюгата использовались иммуноглобулины G (Ig G), меченные золотыми наночастицами. Поскольку в дот-анализе необходимо использование специфической сыворотки, ее получение остается актуальным. Авторами [32] были получены поликлональные кроличьи сыворотки к антигенам холерного вибриона, конъюгированным с наночастицами коллоидного золота. Иммунохимическими методами определены их титры, чувствительность и специфичность по отношению к растворимым иммуногенам и целым клеткам *V. cholerae*. Полученные антисыворотки показали высокую специфическую активность и перспективны для оценки активности антигенов.

Сотрудниками нашего института разработаны комплексные гено- и иммунодиагностические тест-системы для идентификации штаммов *V. cholerae* и оценки уровня экспрессии генов, ответственных за синтез основных иммуногенов холерного вибриона [33–35]. Однако они предназначены для диагностических целей, а их применение на этапах культивирования производственных штаммов-продуцентов ранее не рассматривалось. В связи с этим перспективным является использование современных молекулярно-генетических методов для контроля экспрессии генов, ответственных за синтез антигенных компонентов на этапе культивирования производственных штаммов. Нами была оценена экспрессия гена *ctxA* при глубинном культивировании производственного штамма *V. cholerae* 569В классического биовара методами полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с учетом результатов в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) и цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР). Результаты, полученные с помощью данных методов, свидетельствуют об опережении экспрессии гена *ctxA* на 1–2 часа относительно прироста биомассы и выхода ХТ в культуральную жидкость, регистрируемого иммунохимическими методами. Для оценки продукции основных иммуногенов на этапе культивирования штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 разрабатывается комплекс молекулярно-генетических методов, что позволит оптимизировать условия культивирования и, как следствие, увеличить выход требуемого антигена.

Таким образом, поэтапный контроль компонентов вакцины на разных стадиях технологического процесса позволяет отследить их активность и качество с момента культивирования штаммов-продуцентов. Разработка и применение молекулярно-генетических, микробиологических, иммунохимических методов перспективно для более полного и всестороннего контроля основных иммуногенов производственных штаммов холерного вибриона. Методы контроля, используемые для оценки активности антигенных компонентов холерной вакцины, представлены в таблице.

Перспективными направлениями развития производства холерной бивалентной химической вакцины являются:

- повышение биобезопасности производственного процесса за счет использования авирулентных штаммов-продуцентов;
- увеличение продукции основных иммуногенов холерного вибриона за счет использования штаммов гиперпродуцентов;
- оптимизация условий культивирования за счет внедрения молекулярно-генетических методов, позволяющих контролировать продукцию генов, ответственных за синтез основных иммуногенов холерного вибриона;
- внедрение новых методов стерилизации, позволяющих сохранить активность антигенов;

Методы контроля специфической активности антигенных компонентов холерной химической вакцины
Methods for monitoring the specific activity of the antigenic components of the chemical cholera vaccine

Антигенный компонент Antigenic component	Контролируемое свойство Property under monitoring	Методы контроля Methods of control	
		используемые в настоящее время currently applied	перспективные для внедрения promising for introduction
Холерный токсин Cholera toxin	Токсигенность Toxigenicity	Тест на кроликах-сосунках, ПЦР для детекции гена <i>ctxA</i> с помощью тест-системы для выявления ДНК <i>V. cholerae</i> (<i>ctxA</i> ⁺) (ГенХол) Test on suckling rabbits, PCR for the detection of the <i>ctxA</i> gene using a test system for the detection of <i>V. cholerae</i> DNA (<i>ctxA</i> ⁺) (GenChol)	Метод <i>in vitro</i> с использованием перевиваемых клеточных культур <i>In vitro</i> technique using transplantable cell cultures
	Активность Activity	Метод кожной пробы по Craig на кроликах, реакция диффузионной преципитации, реакция пассивного иммунного гемолиза Craig skin test on rabbits, diffusive precipitation reaction, passive immune hemolysis test	Метод иммуноферментного анализа с использованием GM1-ганглиозидов и дот-иммуноанализа с золотыми наночастицами Enzyme immunoassay using GM1-ganliosides and dot-immunoassay with gold nanoparticles
	Уровень экспрессии генов, ответственных за синтез Rate of gene expression, responsible for synthesis	Не контролируется Not subjected to monitoring	Метод ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени; метод цифровой капельной ПЦР PCR with real-time registration of results; digital drip PCR
Холероген-анатоксин Cholero-gen-anatoxin	Активность Activity	Реакции анатоксина связывания на кроликах Anatoxin binding response in rabbits	Метод иммуноферментного анализа с использованием GM1-ганглиозидов и дот-иммуноанализа с золотыми наночастицами Enzyme immunoassay using GM1-ganliosides and dot-immunoassay with gold nanoparticles
	Остаточная токсичность Residual toxicity	Тест на кроликах-сосунках Test on suckling rabbits	Метод <i>in vitro</i> с использованием перевиваемых клеточных культур и иммуноферментного анализа с использованием GM1-ганглиозидов <i>In vitro</i> method using transplantable cell cultures and enzyme immunoassay using GM1-ganliosides
О-АГ Инаба и Огава Inaba and Ogawa O-antigen	Активность Activity	Реакции непрямого геммагглютинации Indirect hemagglutination reactions	Метод дот-иммуноанализа с золотыми наночастицами на О-АГ Инаба и Огава Dot-immunoassay with gold nanoparticles on Inaba and Ogawa O-antigens
	Уровень экспрессии генов, ответственных за синтез Rate of gene expression, responsible for synthesis	Не контролируется Not subjected to monitoring	Метод ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени; метод цифровой капельной ПЦР PCR with real-time registration of results; digital drip PCR

- переход на малоотходные технологии производства;

- увеличение срока годности готовой продукции.

На этапах изготовления холерной вакцины актуальным остается внедрение новых решений, которые позволят минимизировать временные и материальные затраты, увеличить выход готового продукта без потери его свойств, повысить специфичность и чувствительность методов анализа, применяемых для контроля готового препарата и его компонентов.

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

Список литературы

1. Беспалова И.А., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А. Современное состояние специфической профилактики холеры. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(1):55–61.

2. Щуковская Т.Н., Саяпина Л.В., Кутырев В.В. Вакцинопрофилактика холеры: современное состояние вопроса. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2009; 2:62–7.

3. Waldor M.K., Hotez P.J., Clemens J.D. A national cholera vaccine stockpile – a new humanitarian and diplomatic resource. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363(24):2279–82. DOI: 10.1056/NEJMp1012300.

4. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербачева 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. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101.

5. WHO – Prequalification of Medical Products (IVDs, Medicines, Vaccines and Immunization Devices, Vector Control) [Электронный ресурс]. URL: <https://extranet.who.int/pqweb/vaccines/prequalified-vaccines> (дата обращения 20.09.2021).

6. Джапаридзе М.Н., Караева Л.Т., Сумароков А.А., Марчук Л.М., Никитина Г.П., Наумов А.В., Попов А.А., Коткина Т.А., Петяев И.М., Павлова Л.П. О-антиген *Vibrio cholerae* серовара Огава, рекомендуемый для создания оральной холерной бивалентной химической вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1981; 11:75–81.

7. 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.

8. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.П., Мелешенко М.В., Доброва В.Г., Заворотных В.И., Грачева В.П.,

Захарова Т.Л. Оральная химическая вакцина из гипертоксиогенных штаммов KM-76 Инаба и KM-68 Огава возбудителя холеры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1991; 4:31–3.

9. Топорков А.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ продукции основных протективных антигенов у рекомбинантных и производственных штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2005; 1:53–7.

10. Вольников В.Р., Ульянов А.Ю., Салихов Р.Р., Дуракова О.С., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Волох О.А. Экологическая безопасность и перспективы развития малоотходных технологий в биотехнологическом производстве. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2021; 21(3):317–23. DOI: 10.18500/1816-9775-2021-21-3-317-323.

11. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Мелешенко М.В., Никитина Г.П. Способ получения пероральной химической вакцины. Патент РФ № 2076734, опубл. 10.04.1997. Бюл. № 13.

12. 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. Бюл. № 15.

13. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Космаенко О.М. Способ получения О-антигена холерного очищенного. Патент РФ № 2143280, опубл. 27.12.1999. Бюл. № 36.

14. Дятлов И.А., Нижегородцев С.А., Громова О.В., Васин Ю.Г., Бутов А.С., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Разработка ультрафильтративной технологии получения О-антигена холерного вибриона для производства вакцин. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2001; 2(82):133–9.

15. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Алешина Ю.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И., Крайнова А.Г. Способ концентрирования нативных холерогенанатоксина и О-антигена *Vibrio cholerae* O1 классического биовара штамма 569В серовара Инаба. Патент РФ № 2451522, опубл. 27.05.2012. Бюл. № 15.

16. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Еремин С.А., Алешина Ю.А., Громова О.В., Крайнова А.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И., Васин Ю.Г. Способ концентрирования нативного О-антигена *Vibrio cholerae*. Патент РФ № 2445116, опубл. 20.03.2012. Бюл. № 13.

17. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Еремин С.А., Белякова Н.И., Клокова О.Д., Нижегородцев С.А. Мониторинг активности ферментов при производстве вакцины холерной бивалентной таблетированной. *Биотехнология*. 2010; 2:87–92.

18. Заднова С.П., Волох О.А., Крепостнова И.М., Щелканова Е.Ю., Ливанова Л.Ф., Захарова Т.Л., Шепелев И.А., Еремин С.А., Смирнова Н.И. Изучение продукции основных факторов патогенности и иммуногенности различными штаммами *Vibrio cholerae* при их культивировании в производственных условиях. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2007; 1:51–5.

19. Dukoral, INN – Oral Cholera vaccine [Электронный ресурс]. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/dukoral-epar-scientific-discussion_en.pdf (дата обращения 20.10.2021).

20. Громова О.В., Кузьмиченко И.А., Киреев М.Н., Нижегородцев С.А., Корсуков В.Н. Новый способ получения комплекса ферментов холерного вибриона – протеовибрина с помощью ультрафильтрации. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2012; 5-1:201–5.

21. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.: 2018. С. 5326–36.

22. Russell W.M.S., Burch R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen; 1959. 238 p.

23. Алексеева Л.П., Якушева О.А., Зюзина В.П., Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В. Современные методические приемы очистки холерного токсина. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2019; 15(1):5–9.

24. Гаева А.В., Громова О.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Ливанова Л.Ф., Волох О.А. Определение специфической активности компонентов холерной химической вакцины с использованием культуры клеток. *Биотехнология*. 2020; 36(3):82–9. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-82-89.

25. Маркина О.В., Алексеева Л.П., Телесманич Н.Р., Чемисова О.С., Акулова М.В., Маркин Н.В. GM1-ДОТ-ИФА для выявления токсинпродуцирующих штаммов *Vibrio cholerae*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 5:49–52.

26. Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Осина Н.А., Захарова Т.Л. Получение и характеристика антителопродуцирующих гибридом и моноклональных иммуноглобулинов к энтеротоксину *Vibrio cholerae*. *Биотехнология*. 2014; 30(3):49–54.

27. Гаева А.В., Громова О.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Волох О.А. Современные подходы к контролю активных

компонентов холерной химической вакцины. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018; 1:152–7.

28. Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Крупницкая Ю.А. Выбор системы детекции для мультиплексного дот-иммуноанализа антиген. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(4):229–33. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-229-233.

29. Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы. *Acta Naturae*. 2011; 3(2):36–58.

30. 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.

31. Воробьева С.А., Дуракова О.С., Волох О.А., Громова О.В. Возможность определения специфической активности О-АГ в производстве холерной химической вакцины с помощью дот-анализа. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2018; 18(3):318–9. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319.

32. Дыкман Л.А., Волох О.А., Громова О.В., Дуракова О.С., Воробьева С.А., Киреев М.Н., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К., Щеголев С.Ю., Кутырев В.В. Получение и характеристика антиген к протективным антигенам холерного вибриона, конъюгированным с наночастицами золота. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. 2020; 490(1):27–30. DOI: 10.31857/S2686738920010084.

33. Плеханов Н.А., Заднова С.П., Агафонов Д.А., Смирнова Н.И. Конструирование мультиплексной ПЦР для идентификации токсигенных штаммов генетических вариантов *Vibrio cholerae* эльтор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу. *Биотехнология*. 2015; 31(2):82–90.

34. Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Крепостнова И.М., Захарова Т.Л., Осин А.В., Смирнова Н.И. Комплексная гено- и иммунодиагностическая тест-система для идентификации холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп и оценки их вирулентности. Патент РФ № 2404257, опубл. 20.11.2010. Бюл. № 32.

35. Абдрашитова А.С., Яцьшина С.Б., Осина Н.А., Астахова Т.С., Портенко С.А., Саяпина Л.В., Шипулин Г.А., Щербакова С.А. Разработка мультилокусных амплификационных тест-систем для выявления ускоренной идентификации эпидемически значимых штаммов холерных вибрионов. *Биозащита и биобезопасность*. 2014; 6(2):34–41.

References

- Bespalova I.A., Ivanova I.A., Omel'chenko N.D., Filippenko A.V., Trufanova A.A. [The current state of specific prophylaxis of cholera]. *Epidemiologiya i Vaksinosprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2018; 17(1):55–61.
- Shchukovskaya T.N., Sayapina L.V., Kutyrev V.V. [Vaccine prophylaxis of cholera: present status]. *Epidemiologiya i Vaksinosprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2009; (2):62–7.
- Waldor M.K., Hotez P.J., Clemens J.D. A national cholera vaccine stockpile – a new humanitarian and diplomatic resource. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363(24):2279–82. DOI: 10.1056/NEJMp1012300.
- Onischenko G.G., Popova A.Yu., Kutyrev V.V., Smirnova N.I., Shcherbakova S.A., Moskvitina E.A., Titova S.V. Actual problems of epidemiologic control, laboratory diagnostics and prophylaxis of cholera in the Russian Federation. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2016; (1):89–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101.
- WHO – Prequalification of Medical Products (IVDs, Medicines, Vaccines and Immunization Devices, Vector Control). (Cited 20 Sept 2021). [Internet]. Available from: <https://extranet.who.int/pqweb/vaccines/prequalified-vaccines>.
- Dzhabaridze M.N., Karaeva L.T., Sumarokov A.A., Marchuk L.M., Nikitina G.P., Naumov A.V., Popov A.A., Kotkina T.A., Petyaev I.M., Pavlova L.P. [O-antigen of *Vibrio cholerae*, serovar Ogawa, for the preparation of oral cholera bivalent chemical vaccine]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1981; (11):75–81.
- Goryaev A.A., Sayapina L.V., Obukhov Yu.I., Bondarev V.P. [Efficacy and safety of vaccines for the prevention of cholera]. *Biopreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie [Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2018; 18(1):42–9. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-42-49.
- Dzhabaridze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.P., Meleshchenko M.V., Dobrova V.G., Zavorotnykh V.I., Gracheva V.P., Zakharova T.L. [Oral chemical vaccine prepared on the basis of hypertoxygenic strains KM-76 Inaba and KM-68 Ogawa of the causative agent of cholera]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii*

i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 1991; (4):31–3.

9. Toporkov A.V., Zadnova S.P., Smirnova N.I. [Comparative analysis of the major protective antigens production in *Vibrio cholerae* recombinant and producer strains of the classical biovar]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2005; (1):53–7.

10. Vol'nikov V.R., Ul'yanov A.Yu., Salikhov R.R., Durakova O.S., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Volokh O.A. [Ecological safety and prospects of development of low-waste technologies in the biotechnology industry]. *Izvestiya Saratovskogo Universiteta. Novaya Seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya [Bulletin of the Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology]*. 2021; 21(3):317–23. DOI: 10.18500/1816-9775-2021-21-3-317-323.

11. Dzhaparidze M.N., Naumov A.V., Meleshchenko M.V., Nikitina G.P. [Method for the production of oral chemical vaccine]. RF patent No. 2076734, publ. April 10, 1997. Bull. No. 13.

12. Anisimov P.I., Adamov A.K., Dzhaparidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.P. [Method for the production of a vaccine for the prevention of cholera]. RF patent No. 2080121, publ. May 27, 1997. Bull. No. 15.

13. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Kosmaenko O.M. [Method for obtaining purified cholera O-antigen]. RF patent No. 2143280, publ. December 27, 1999. Bull. No. 36.

14. Dyatlov I.A., Nizhegorodtsev S.A., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Butov A.S., Klokoval O.D., Belyakova N.I. [Development of an ultrafiltration technology for obtaining O-antigen of cholera vibrio for the production of vaccines]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2001; 2(82):133–9.

15. Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Aleshina Yu.A., Eremin S.A., Vasin Yu.G., Klokoval O.D., Belyakova N.I., Krainova A.G. [Method for concentrating native cholera toxin and O-antigen of *Vibrio cholerae* O1 of the classical biovar, strain 569B of the serovar Inaba]. RF patent No. 2451522, publ. May 27, 2012. Bull. No. 15.

16. Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Gromova O.V., Krainova A.G., Klokoval O.D., Belyakova N.I., Vasin Yu.G. [Method for concentrating native O-antigen of *Vibrio cholerae*]. RF patent No. 2445116, publ. March 20, 2012. Bull. No. 13.

17. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Eremin S.A., Belyakova N.I., Klokoval O.D., Nizhegorodtsev S.A. [Monitoring of enzyme activity in the production of bivalent cholera vaccine]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2010; (2):87–92.

18. Zadnova S.P., Volokh O.A., Krepostnova I.M., Shchelkanova E.Yu., Livanova L.F., Zakharova T.L., Shepelev I.A., Eremin S.A., Smirnova N.I. Study of the generation of the main factors of pathogenicity and immunogenicity by various strains of *Vibrio cholerae* during their cultivation under production conditions. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2007; (1):51–5.

19. Dukoral, INN – Oral Cholera vaccine. (Cited 20 Oct 2021). [Internet]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/dukoral-epar-scientific-discussion_en.pdf.

20. Gromova O.V., Kuz'michenko I.A., Kireev M.N., Nizhegorodtsev S.A., Korsukov V.N. [A new method for obtaining a complex of *Vibrio cholerae* enzymes – proteovibrin, using ultrafiltration]. *Bulleten' Vostochno-Sibirskogo Nauchnogo Tsentra Sibirskogo Otdeleniya Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk [Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences]*. 2012; (5-1):201–5.

21. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV edition. Vol. 4. Moscow: 2018. P. 5326–36.

22. Russell W.M.S., Burch R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen; 1959. 238 p.

23. Alekseeva L.P., Yakusheva O.A., Zyuzina V.P., Duvanova O.V., Shipko E.S., Pisanov R.V. [Modern methodological approaches to purification of cholera toxin]. *Vestnik Biotechnologii i Fiziko-Khimicheskoi Biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova [Bulletin of Biotechnology and Physico-Chemical Biology Named after Yu.A. Ovchinnikov]*. 2019; 15(1):5–9.

24. Gaeva A.V., Gromova O.V., Durakova O.S., Generalov S.V., Livanova L.F., Volokh O.A. [Determination of the specific ac-

tivity of the components of the chemical cholera vaccine using cell cultures]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2020; 36(3):82–9. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-82-89.

25. Markina O.V., Alekseeva L.P., Telesmanich N.R., Chemisova O.S., Akulova M.V., Markin N.V. [GM1-DOT-ELISA for the detection of toxin-producing strains of *Vibrio cholerae*]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2011; (5):49–52.

26. Mikheeva E.A., Devdariani Z.L., Osina N.A., Zakharova T.L. [Obtaining and characterization of antibody-producing hybridomas and monoclonal immunoglobulins to *Vibrio cholerae* enterotoxin]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2014; 30(3):49–54.

27. Gaeva A.V., Gromova O.V., Durakova O.S., Generalov S.V., Volokh O.A. [Modern approaches to the control of active components of cholera chemical vaccine]. *Razrabotka i Registratsiya Lekarnykh Sredstv [Drug Development and Registration]*. 2018; (1):152–7.

28. Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Krupnitskaya Yu.A. [Selection of system of detection for multiplex dot-immune analysis of antibodies]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2016; 61(4):229–33. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-229-233.

29. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. [Gold nanoparticles in biology and medicine: recent achievements and prospects]. *Acta Naturae*. 2011; 3(2):36–58.

30. Durakova O.S., Gromova O.V., Kireev M.N., Vorob'eva S.A., Klokoval 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 Biotechnologii i Fiziko-Khimicheskoi Biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova [Bulletin of Biotechnology and Physico-Chemical Biology Named after Yu.A. Ovchinnikov]*. 2018; 14(4):10–3.

31. Vorob'eva S.A., Durakova O.S., Volokh O.A., Gromova O.V. [The possibility of determining the specific activity of O-AG in the production of cholera chemical vaccine using dot-assay]. *Izvestiya Saratovskogo Universiteta. Novaya Seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya [Bulletin of the Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology]*. 2018; 18(3):318–9. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319.

32. Dykman L.A., Volokh O.A., Gromova O.V., Durakova O.S., Vorob'eva S.A., Kireev M.N., Livanova L.F., Nikiforov A.K., Shchegolev S.Yu., Kutyrev V.V. [Preparation and characterization of antibodies to protective antigens of *Vibrio cholerae*, conjugated with gold nanoparticles]. *Doklady Rossiiskoi Akademii Nauk. Nauki o Zhizni [Reports of the Russian Academy of Sciences. Life Sciences]*. 2020; 490(1):27–30. DOI: 10.31857/S2686738920010084.

33. Plekhanov N.A., Zadnova S.P., Agafonov D.A., Smirnova N.I. [Construction of multiplex PCR for identification of toxigenic strains of genetic variants of El Tor *Vibrio cholerae* and their differentiation by epidemic potential]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2015; 31(2):82–90.

34. Zadnova S.P., Livanova L.F., Krepostnova I.M., Zakharova T.L., Osin A.V., Smirnova N.I. [Complex geno- and immunodiagnostic test system for identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups and assessment of their virulence]. RF patent No. 2404257, publ. November 20, 2010. Bull. No. 32.

35. Abdrashitova A.S., Yatsyshina S.B., Osina N.A., Astakhova T.S., Portenko S.A., Sayapina L.V., Shipulin G.A., Shcherbakova S.A. [Development of multilocus amplification test systems for the detection of accelerated identification of epidemically significant strains of *V. cholerae*]. *Biozashchita i Biobezopasnost' [Biosecurity and Biosafety]*. 2014; 6(2):34–41.

Authors:

Vorob'eva S.A., Durakova O.S., Gromova O.V., Volokh O.A., Klokoval O.D., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Воробьева С.А., Дуракова О.С., Громова О.В., Волох О.А., Клокова О.Д., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.