

ДУРАКОВА ОКСАНА СЕРГЕЕВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ
СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИГЕНОВ
ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ**

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора)

Научные руководители

Громова Ольга Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент, Федеральное казенное учреждение науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория холерных вакцин, старший научный сотрудник

Волох Оксана Александровна, кандидат биологических наук, Федеральное казенное учреждение науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, отдел профилактических препаратов, заведующая отделом

Официальные оппоненты:

Саяпина Лидия Васильевна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Управление экспертизы противобактериальных иммунобиологических препаратов, главный эксперт, г. Москва

Кафтырева Лидия Алексеевна, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория кишечных инфекций, заведующая лабораторией, г. Санкт-Петербург

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь

Защита состоится «22» сентября 2023 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 64.1.002.01

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В настоящее время заболеваемость холерой в мире представляет серьезную угрозу общественному здравоохранению. В 2022 г. зарегистрировано более 1,2 млн случаев холеры в 36 странах мира. По мнению экспертов в 2023 г. сохранятся риски завоза инфекции на территорию РФ, связанные с активацией эпидемического процесса в странах Азии и Африки (Носков А. К. и др., 2023; WHO 2023).

Официальная стратегия Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) предполагает использование оральных холерных вакцин в качестве дополнительной меры предотвращения возникновения эпидемий холеры (WHO 2010, 2017). За рубежом представлены преqualифицированные ВОЗ оральные, цельноклеточные, инактивированные вакцины против холеры: Dukoral (Швеция), Shanchol (Индия), Euvichol и Euvichol-Plus (Южная Корея). Специфическую активность компонентов данных вакцин определяют иммуноферментным анализом (ИФА) (Levine M.M. *et al.*, 2017).

В России вакцинация против холеры включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям (Приказ Минздрава РФ № 1122н). Единственным препаратом для профилактики холеры в РФ является «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой», производства ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, в состав которой входит холероген-анатоксин (ХА), полученный в результате формоловой детоксикации холерного токсина (ХТ), и О-антиген (О-Аг) (Бургасов В.Н. и др., 1979; Джапаридзе М.Н. и др., 1981,1982,1993). По эффективности отечественная вакцина не уступает зарубежным аналогам (Щуковская Т.Н. и др., 2009). В соответствии с Промышленным Регламентом (ПР), определение специфической активности ХТ и ХА проводится методами *in vivo* с использованием лабораторных животных.

Определяющую роль в получении качественного продукта микробного синтеза играют питательные среды, эффективность которых оценивается по выходу биомассы. Вопрос стабильно высокой продукции антигенов чрезвычайно важен и требует дополнительных критериев оценки эффективности культивирования, таких как выход «целевого продукта» – антигенных компонентов (Еремин С.А. и др., 2013; Никифоров А.К. и др., 2015). 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 условиях производственного цикла (ГФ РФ XIV, 2018). Штаммы холерных вибрионов О1 серогруппы – *Vibrio cholerae cholerae* 569В серовара Инаба и *Vibrio cholerae cholerae* М-41 серовара Огава с 1995 г. используются на этапе получения специфических антигенов холерной вакцины, сохраняя

свои основные культурально-морфологические свойства и продуктивные параметры, но с учетом возможностей современных технологий, включающих методы оценки молекулярно-генетических структур и целого ряда морфометрических характеристик, будет информативным применение современных методов для оценки свойств штаммов-продуцентов (Челдышова Н.Б. и др., 2015; Ерохин П.С. и др., 2016; Уткин Д.В. и др., 2019; Hartmann M. *et al.*, 2010).

В соответствии с рекомендациями ВОЗ, на современном этапе развития производства иммунобиологических лекарственных препаратов актуальной задачей является разработка стандартных, воспроизводимых методов контроля специфической активности антигенов *in vitro*, сопоставимых по чувствительности с методами *in vivo* для контроля компонентов вакцин (WHO, 2017; Akkermans A. *et al.*, 2020).

Для определения специфической активности ХТ и индикации токсигенных штаммов *V. cholerae* широко апробированными являются варианты ИФА – GM₁ ELISA (Svennerholm A.M., Wiklund G., 1983), GM₁-дот-ИФА (Маркина О.В. и др., 2011), дот-иммуноанализ (ДИА) (Девдариани З.Л. и др., 1999, Федорова В.А. и др., 2000). В литературных источниках приводятся результаты исследований, свидетельствующие о возможности использования клеточных культур для тестирования ХТ (Сальникова О.И., 1994; Алексеева Л.П. и др., 2019). Для контроля активности ХТ и ХА в производстве холерной химической вакцины, используется стандартный образец предприятия «Тест-токсин холерный» (СОП ХТ), получение которого является многостадийным процессом. Актуальной является разработка новых методических подходов получения препарата ХТ.

Актуальной задачей является замена методов определения специфической активности антигенов с использованием лабораторных животных на высокочувствительные, воспроизводимые методы *in vitro* и разработка способов контроля стабильности штаммов-продуцентов.

Цель работы: формирование методических подходов к разработке и применению методов *in vitro* для контроля специфической активности основных антигенов холерной химической вакцины и поиск дополнительных информативных критериев доказательства стабильного сохранения исходных параметров штаммами-продуцентами.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:
1. Экспериментально обосновать возможность применения методов *in vitro* для контроля специфической активности холерного токсина, О-антигена и холерогена-анатоксина на этапах производства холерной химической вакцины.

2. С использованием современных методов охарактеризовать свойства и морфометрические параметры штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов специфических антигенов холерной химической вакцины на этапах культивирования.
3. Для стандартизации процесса глубинного культивирования производственных штаммов *Vibrio cholerae* 569В и М-41 экспериментально обосновать применение питательной среды на основе сухого ферментативного гидролизата казеина.
4. Оптимизировать условия и разработать способ получения препарата холерного токсина, соответствующего требованиям к стандартному образцу предприятия «Тест-токсин холерный».

Научная новизна. Экспериментально обоснована возможность замены методов контроля холерного токсина с использованием лабораторных животных на информативные иммунохимические методы *in vitro* (иммуноферментный анализ с использованием GM₁-ганглиозидов, дот-иммуноанализ с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом, радиальный пассивный иммунный гемолиз). Установлена корреляция между результатами определения активности холерного токсина и О-антигена *in vitro* и *in vivo*, коэффициент корреляции от 0,8 до 0,96. Опытным путем доказана возможность использования перевиваемой клеточной линии СНО-К1 для определения специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина в производстве холерной химической вакцины. Установлена корреляция между результатами определения активности холерного токсина и холерогена-анатоксина *in vitro* и *in vivo*, коэффициент корреляции от 0,82 до 0,93.

В производственных условиях с применением методов атомно-силовой и трансмиссионной электронной микроскопии доказана стабильность культурально-морфологических свойств штаммов *Vibrio cholerae* 569В и М-41. Методом полногеномного секвенирования показана стабильность нуклеотидных последовательностей полного генома штаммов *Vibrio cholerae* 569В и М-41 на всех стадиях производственного цикла.

Установлена стабильность повышенной продукции протективных антигенов *Vibrio cholerae* при культивировании на питательной среде на основе сухого ферментативного гидролизата казеина. Проведен ретроспективный анализ эффективности питательной среды для глубинного культивирования производственных штаммов холерного вибриона и оценена стабильность показателей количества биомассы и выхода специфических антигенов.

Впервые разработана оригинальная методика последовательного применения методов ультрафильтрации, ЛПС-адсорбции и гель-хроматографии, которая позволяет получать препарат холерного токсина, соответствующий требованиям к СОП

«Тест-токсин холерный». Приоритет исследований подтвержден патентом РФ 2799574 «Способ получения холерного токсина для контроля производства холерной химической вакцины» (опубликован 06.07.2023 г., бюл. № 19).

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что подтверждена целесообразность использования в производстве холерной химической вакцины новых методических подходов контроля качества, имеющих целью замены методов *in vivo*, применяемых в технологии приготовления названного иммунобиологического лекарственного препарата. Результаты работы служат основой для исследований в сфере развития методических приемов оценки свойств специфических компонентов и готовой лекарственной формы вакцин.

Усовершенствованы методы контроля активности холерного токсина, холерогена-анатоксина и О-антигена на этапах производства холерной химической вакцины. Разработан вариант непрямого дот-иммуноанализа с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом для определения специфической активности антигенов холерной химической вакцины. Доказана возможность использования перевиваемой клеточной линии СНО-К1 для оценки специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина в производстве холерной химической вакцины. Предложено совместное применение методов полимеразной цепной реакции и радиального пассивного иммунного гемолиза для контроля токсигенности бульонной культуры штамма *Vibrio cholerae* 569В и замена метода *in vivo* (внедрено в производство, ПР 01898109-65-22/1000, ПР 01898109-65-22/10000) – федеральный уровень внедрения.

Разработан алгоритм применения методов полимеразной цепной реакции, радиального пассивного иммунного гемолиза, иммуноферментного анализа с использованием GM₁-ганглиозидов, дот-иммуноанализа с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом и тестов на клетках СНО-К1, позволяющий на этапах производства холерной химической вакцины определить иммунохимическую и биологическую активность холерного токсина и холерогена-анатоксина. Внедрение новых методов контроля специфической активности антигенов позволит оптимизировать процесс производства вакцины, уменьшить временные и материальные затраты.

Стандартизирован этап культивирования штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов протективных антигенов за счет перехода на использование сухих компонентов питательных сред (внедрено в производство, ПР 01898109-65-22/1000, ПР 01898109-65-22/10000) – федеральный уровень внедрения.

Выделен с использованием оригинальной методики холерный токсин и показано его соответствие стандартному образцу предприятия «Тест-токсин холерный».

В Государственную коллекцию патогенных бактерий (ГКПБ) ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора депонированы два штамма *Vibrio cholerae* O1 классического биовара KM2129 (569В) серовара Инаба и *Vibrio cholerae* O1 классического биовара KM2130 (М-41) серовара Огава, как производственные линии природных штаммов, используемых для изготовления иммунобиологического лекарственного препарата «Вакцина холерная бивалентная химическая» (05.07.2022 г.) – федеральный уровень внедрения.

Результаты исследований использовались при разработке промышленных регламентов № ПР 01898109-65-22/1000, № ПР 01898109-65-22/10000 на производство «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой» – федеральный уровень внедрения.

Разработаны методические рекомендации учрежденческого уровня внедрения: «Методические рекомендации по определению активности холерного токсина в процессе производства холерной химической вакцины методами иммуноферментного анализа и радиального пассивного иммунного гемолиза» (утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 6 от 22.12.2016 г.); «Методические рекомендации по применению ДОТ-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины» (утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 5 от 19.12.2017 г.); «Методические рекомендации по использованию культуры клеток для анализа активности холерного токсина на этапах производства компонентов холерной химической вакцины» (утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 8 от 7.12.2018 г.); «Методические рекомендации по определению специфической активности компонентов холерной вакцины с использованием культуры клеток» (утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 4 от 8.11.2019 г.) (акт внедрения от 14.06.2023 г.).

Методология исследования. Основой методологии в диссертационной работе явилось изучение микробиологических и биотехнологических подходов в производстве вакцины холерной. При выполнении работы применяли микробиологические, биологические, иммунохимические, молекулярно-генетические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный алгоритм применения методов *in vitro* для контроля активности антигенов на этапах производства холерной химической вакцины позволяет определять специфическую активность антигенов вакцины.
2. Применение комплекса современных молекулярно-генетических и микроскопических методов позволяет адекватно характеризовать стабильность свойств производственных штаммов *Vibrio cholerae* 569В и М-41 на этапах культивирования.

3. Использование питательной среды на основе сухого гидролизата казеина при глубинном культивировании производственных штаммов позволяет стабильно увеличить выход антигенов.

4. Оптимизированные условия продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* при культивировании в биореакторе и разработанный способ получения холерного токсина позволяют получать препарат, соответствующий требованиям к стандартному образцу предприятия «Тест-токсин холерный».

Степень достоверности. Достоверность работы основана на значительном объеме экспериментов и полученных в ходе исследования данных, их статистической обработке, соответствии теоретическим данным, применении современных актуальных методов, соответствующих цели и задачам работы. Эксперименты проводились с использованием измерительных приборов, прошедших метрологическую поверку.

Апробация результатов. Материалы диссертации представлены на Межгосударственных, Всероссийских с международным участием, Всероссийских и местных конференциях: XIII Межгосударственной научно-практической конференции «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года» (Саратов, 2016); XXII и XXIII Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018; 2019); XIV Межгосударственной научно-практической конференции «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ» (Саратов, 2018); конгрессе «Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022» (Москва, 2022); VII Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы биомедицинской инженерии» (Саратов, 2017); XI съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (Москва, 2017); II Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2017); XI Всероссийской научно-практической конференции «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Уфа, 2019); XII Всероссийской научно-практической конференции «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Ростов-на-Дону, 2020); Всероссийской научно-практической конференции «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы» (Нижний Новгород, 2021); XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Екатеринбург, 2021); ежегодных научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2017-2022).

Личный вклад автора. Личное участие автора заключалось в определении цели и задач работы, нахождении эффективных решений поставленных задач, планировании с последующей постановкой экспериментов и интерпретации результатов, оформлении научных статей, разработке методических документов. Некоторые экспериментальные исследования проведены совместно с к.б.н. Кузнецовым О.С., к.ф.-х.н. Ерохиным П.С., к.х.н. Красновым Я.М., к.б.н. Генераловым С.В.

Связь работы с научными программами. Работа выполнена в лаборатории холерных вакцин ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора в рамках НИР: 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов» (номер госрегистрации 01201457722); 70-2-17 «Разработка и совершенствование биотехнологий промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы» (номер госрегистрации АААА-А16-116112810063-4), 83-2-20 «Совершенствование этапов производства и методов контроля лечебно-профилактических и диагностических препаратов» (номер госрегистрации АААА-А20-120012090035-1); 89-2-21 «Научно-прикладные аспекты производства и совершенствования препаратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (номер госрегистрации АААА-А21-121012090066-4).

Публикация научных трудов. По материалам работы опубликовано 26 научных работ, из которых 9 статей в изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки», 1 патент на изобретение, 16 публикаций в сборниках и материалах конференций и иных изданиях.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 177 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы, состоящего из 235 источников, из которых 99 отечественных и 136 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 26 рисунками и 21 таблицей.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Обзор литературы

В обзоре литературы освещены современные холерные вакцины, их активные компоненты и методы контроля, требования к стабильности штаммов-продуцентов. Изучен вопрос о необходимости разработки новых методов контроля специфической активности антигенов и стабильности штаммов-продуцентов.

2.2 Материалы и методы

В работе использованы штаммы *V. cholerae*, полученные из ГКПБ ФКУН Российский противочумный институт «Микроб»: 2 производственных, 9 природных и 4 рекомбинантных. Рекомбинантные штаммы сконструированы в отделе микробиологии института «Микроб» под руководством профессора Смирновой Н.И.

Микробиологические методы. Концентрацию микробных клеток определяли денситометрически и по ФСО 3.1.00086 (ОСО 42-28-86) (5МЕ). Морфологию холерных вибрионов исследовали на световом, атомно-силовом, трансмиссионном электронном микроскопах. Типичность роста и микробиологическую чистоту – высевом на агар и бульон Хоттингера (рН 7,6±0,1).

Биотехнологические методы. Культивирование штаммов *V. cholerae* проводили в биореакторах (рабочие объемы 1,0 л и 200,0 л) с аэрацией и подкормкой глюкозой, на термостатируемом шейкере-инкубаторе в колбах Эрленмейера. ХА и О-Аг получали из бульонных культур штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 в соответствии с ПР.

Биологические методы. В работе использовали перевиваемые клеточные линии СНО-К1, Vero; взрослых кроликов ($2,3 \pm 0,2$) кг и кроликов-сосунков (9 ± 1) суточного возраста, массой (120 ± 10) г породы шиншилла. Работу проводили в соответствии с требованиями обращения с животными и протоколами комиссии по биоэтике.

Иммунохимические и биохимические методы. Концентрацию белка определяли по Lowry (1951). Электрофорез проводили по Laemmli (1970), иммуноблоттинг по методу Towbin (1979). Активность ХТ определяли методами: реакция диффузионной преципитации (РДП) (Ouchterlony O., 1949), радиальный пассивный иммунный гемолиз (РПИГ) (Bramucci M. G., Holmes R. K., 1978; Шагинян И.А., Маракуша Б.М. 1983), иммуноферментного анализа с использованием GM₁-ганглиозидов (GM₁ ELISA) (по Svennerholm A.M. *et al.*, 1992), дот-иммуноанализа с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом (ДИА ЗНЧ). В качестве специфических антител использовали О-агглютинирующую (О1) и антихолерогенную (СОП АХС) сыворотки.

Молекулярно-генетические методы. Присутствие гена *ctxA* у штаммов *V. cholerae* определяли методом ПЦР с использованием тест-системы ГенХол (*ctxA*+). Полногеномное секвенирование штаммов проводили на платформе Ion Torrent PGM с использованием чипа Ion 318 Chip Kit, набора реагентов Ion PGM Hi-Q View Chef 400 Kit и программы SeqAnalyzer 1.5.

Статистическую обработку результатов проводили, рассчитывая среднее арифметическое значение (М), среднее квадратичное отклонение (sx) и стандартную ошибку среднего (mM). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (Гланц С., 1998; Кобзарь А.И., 2006). Коэффициент корреляции рассчитывали по Пирсону (Лакин Г. Ф., 1990). Значения коэффициента корреляции Пирсона интерпретировали в соответствии со шкалой Чеддока. Вычисления осуществляли с применением программы Microsoft Office Excel 2010.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальное обоснование применения комплекса методов *in vitro* для контроля специфической активности антигенов на этапах производства холерной химической вакцины

Стабильность присутствия гена *ctxA* в геноме штамма *V. cholerae* 569В в процессе его глубинного культивирования определяли методом ПЦР. Результаты оценивали по наличию ампликонов, соответствующих по размеру положительному контролю

(564 н.п.). Были взяты 24 образца реакторной культуры данного штамма в стационарной фазе роста (10 ч). Во всех образцах были выявлены фрагменты ДНК размером 564 н.п., соответствующие нуклеотидной последовательности *ctxA* гена.

Для изучения возможности применения методов *in vitro* для определения специфической активности ХТ в процессе глубинного культивирования были отобраны образцы реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В в стационарной фазе роста. За титр в РПИГ принимали минимальное разведение образца ХТ, которое образует зону лизиса эритроцитов, результат в GM₁ ELISA считали: положительным, если ОПобр \geq ОП(К-) \times 2; отрицательным, если ОПобр $<$ ОПср(К-) \times 2 (постановка и учет реакций – 6 ч). При определении активности ХТ ДИА ЗНЧ за титр антигена принимали наибольшее разведение, при котором регистрировали четко различимое цветное пятно (постановка и учет реакции – 2 ч). Параллельно образцы проверяли в соответствии с ПР на животных: активность ХТ в кожной пробе по Крейгу на двух кроликах (постановка и учет реакции – 24 ч); на трех кроликах-сосунках по наличию выраженного «синдрома холерогенности» (постановка и учет реакции – 72 ч) (таблица 1). Коэффициент корреляции Пирсона между результатами, полученными методом кожной пробы по Крейгу и методами *in vitro*, составил: GM₁ ELISA – 0,96, РПИГ – 0,77, ДИА ЗНЧ – 0,87, что свидетельствует о высокой корреляции и сопоставимости методов.

При определении активности О-Аг ДИА ЗНЧ в образцах реакторной культуры штамма *V. cholerae* М-41 в стационарной фазе роста за титр антигена принимали наибольшее разведение, при котором регистрировали четко различимое цветное пятно (постановка и учет реакции – 2 ч). В соответствии с ПР активность О-Аг контролировали в РДП с О1-сывороткой (постановка и учет реакции – 24 ч). Установлено, что при повышении значения титра в РДП (от 8,0 \pm 0 до 26,6 \pm 5,3) значения титров ДИА ЗНЧ имели аналогичную динамику (от 106,6 \pm 21,3 до 1365,3 \pm 341,3). Отмечена высокая степень корреляции между результатами ДИА ЗНЧ и РДП (коэффициент корреляции Пирсона 0,8).

Была изучена возможность использования ДИА ЗНЧ для определения специфической активности ХА. Проанализировано 6 серий лиофилизированного ХА. В ДИА ЗНЧ за титр антигена принимали наибольшее разведение, при котором регистрировали четко различимое цветное пятно (постановка и учет реакции – 2 ч). В соответствии с ПР специфическую активность ХА определяли в реакции анатоксиносвязывания в единицах связывания (ЕС). На проверку одной серии ХА использовали двух кроликов (постановка и учет реакции – 24 ч). Установлено, что при повышении значения титра реакции анатоксиносвязывания (от 4000 до 10000) значение титров ДИА ЗНЧ имели аналогичную динамику (от 170,6 \pm 42,6 до 682,6 \pm 170,6). Коэффициент корреляции Пирсона между результатами ДИА ЗНЧ и реакции анатоксиносвязывания – 0,8.

Таблица 1 – Результаты определения специфической активности ХТ и наличия гена *ctxA* в образцах реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В методами *in vivo* и *in vitro* (n=3)

№ образца	Крейн* (<i>in vivo</i>)	РПИГ* (<i>in vitro</i>)	GM ₁ ELISA* (<i>in vitro</i>)	ДИА ЗНЧ* (<i>in vitro</i>)	Кролики-сосунки** (<i>in vivo</i>)	ПЦР*** (<i>in vitro</i>)
1	24000	53,3±10,6	42,6±10,6	-	+	+
2	24000	53,3±10,6	42,6±10,6	-	+	+
3	32000	85,3±21,3	53,3±10,6	-	+	+
4	192000	341,3±85,3	341,3±85,3	-	+	+
5	64000	106,6±21,3	42,6±10,6	-	+	+
6	192000	384,0±128,0	341,3±85,3	-	+	+
7	96000	13,3±2,6	106,6±21,3	-	+	+
8	192000	341,3±85,3	426,6±85,3	-	+	+
9	64000	85,3±21,3	85,3±21,3	-	+	+
10	24000	106,6±21,3	26,6±5,3	-	+	+
11	48000	106,6±21,3	42,6±10,6	-	+	+
12	80000	341,3±85,3	53,3±10,6	-	+	+
13	32000	85,3±21,3	-	85,3±21,3	+	+
14	96000	213,3±42,6	-	106,6±21,3	+	+
15	80000	213,3±42,6	-	106,6±21,3	+	+
16	16000	53,3±10,6	-	21,3±5,3	+	+
17	92000	384,0±128,0	-	170,6±42,6	+	+
18	32000	85,3±21,3	-	21,3±5,3	+	+
19	48000	85,3±21,3	-	53,3±10,6	+	+
20	16000	21,3±5,3	-	13,3±2,6	+	+
21	48000	53,3±10,6	-	26,6±5,3	+	+
22	64000	85,3±21,3	-	42,6±10,6	+	+
23	32000	213,3±42,6	-	53,3±10,6	+	+
24	128000	384,0±128,0	-	170,6±42,6	+	+

Примечание: *реципрокный титр; **«+» – выраженный «синдром холерогенности» в толстом кишечнике кролика-сосунка; *** «+» – наличие гена *ctxA*; «-» – не определяли.

Далее определяли активность ХА в 6 сериях холерной химической вакцины. Во всех изученных сериях вакцины использование ДИА ЗНЧ позволяло определить ХА (таблица 2). Коэффициент корреляции Пирсона между полученными результатами составил 0,9, что свидетельствует о высокой корреляции и сопоставимости методов.

Таким образом, в ходе проведенного исследования экспериментально обоснована возможность применения ДИА ЗНЧ для оценки специфической активности О-Аг и ХТ в культуральной жидкости штаммов-продуцентов, ХА в лиофилизированном виде и в готовой лекарственной форме вакцины.

На следующем этапе проводилась работа по оценке возможного использования GM₁ ELISA для определения специфической безвредности готовой лекарственной формы. Согласно ПР при внутрикожном введении кроликам вакцины в разведении

1:6000 не должны образоваться папулы (постановка и учет реакции – 24 ч). В результате исследования 8 серий вакцины установлено, что в разведении не более 1:6000 во всех образцах папулы не образовались, а в GM₁ ELISA отсутствовало специфическое окрашивание во всех разведениях в отличие от контроля.

Таблица 2 – Специфическая активность ХА в готовой лекарственной форме при определении в ДИА ЗНЧ и реакции анатоксиносвязывания (n=3)

№ серий вакцины	По анатоксиносвязыванию в ед. ЕС* (<i>in vivo</i>)	ДИА ЗНЧ* (<i>in vitro</i>)
4	120000	1365,3±341,3
5	100000	853,3±170,6
6	100000	682,6±170,6
7	120000	1706,6±341,3
8	100000	682,6±170,6
9	120000	1706,6±341,3
10	100000	853,3±170,6

Примечание: * реципрокный титр

Далее была изучена возможность использования перевиваемых клеточных линий Vero и СНО-К1 для контроля активности антигенов. В работе использовали 8 образцов реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В в стационарной фазе роста. Коэффициент корреляции Пирсона между результатами кожной пробы и теста на клетках СНО-К1 составил 0,93 (таблица 3), на клетках Vero – 0,1 (корреляция не установлена). Полученные результаты показали возможность применения клеточной линии СНО-К1 для определения наличия и уровня специфической активности ХТ в образцах реакторной культуры при производстве холерной химической вакцины.

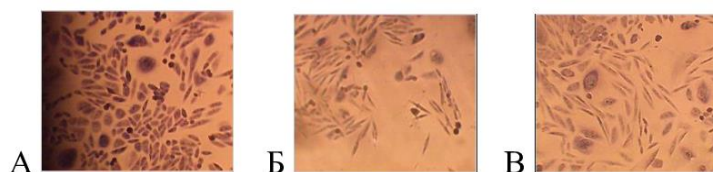
Таблица 3 – Результаты определения специфической активности ХТ в образцах реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В на клетках перевиваемой линии СНО-К1 и в кожной пробе по Крейгу (n=3)

№ образца	Крейг* (<i>in vivo</i>)	Активность на клетках СНО-К1* (<i>in vitro</i>)
1	32000	426,6±106,6
2	64000	533,3±106,6
3	24000	66,6±13,3
4	128000	1066,6±213,3
5	48000	533,3±106,6
6	32000	426,6±106,6
7	32000	426,6±106,6
8	32000	266,6±53,3

Примечание: * реципрокный титр

Далее исследовали возможность использования клеточной линии СНО-К1 для определения специфической активности ХА в лиофилизированном виде. Для постановки анализа готовили растворы ХА с концентрацией 1 мг/мл. Определение актив-

ности ХА с использованием культуры клеток СНО-К1 показало специфическое изменение клеток в положительном контроле с ХТ и образцах реакционной смеси (ХА+СОП ХТ+СОП АХС) (рисунок 1). Значения активности ХА, полученные при использовании клеточной линии СНО-К1, соответствовали (титр от $4666,6 \pm 666,6$ до $8666,6 \pm 666,6$) значениям, полученным в реакции анатоксиносвязывания на кроликах (титр от 4000 до 8000). В результате исследования отмечена высокая степень корреляции между результатами реакции анатоксиносвязывания, полученными методами *in vivo* и *in vitro* (коэффициент корреляции 0,82). Установлено, что специфическая активность ХА по анатоксиносвязыванию составляет не менее 2000 ЕС в 1 мг ХА по цитотоксическому воздействию на клетки линии СНО-К1.



А – интактные клетки СНО-К1 (контроль отрицательный); Б – СОП ХТ на клеточную линию СНО-К1 (контроль положительный);
В – воздействие реакционной смеси (ХА+СОП ХТ+СОП АХС) на клетки СНО-К1

Рисунок 1 – Определение специфической активности ХА с использованием культуры клеток СНО-К1 ($\times 100$)

Согласно ПР специфическая безвредность ХА оценивается на модели кроликов-сосунков: при внутрикишечном введении ХА в количестве 100000 ЕС (15 ± 3 мг/мл) должен отсутствовать «синдром холерогенности» (постановка и учет реакции – 72 ч). Для оценки возможного использования клеток линии СНО-К1 были взяты образцы 8 серий ХА в количестве, соответствующем 100000 ЕС каждый. Затем делали ряд двукратных разведений каждого образца в 0,9 % NaCl в диапазоне с цельного по 1:2048 и вносили в лунки предварительно подготовленного планшета с монослоем клеточной линии СНО-К1 по 100 мкл, начиная с наименьшего разведения. Планшеты помещали в CO_2 -инкубатор при температуре ($37,0 \pm 0,2$) °C и 5 % CO_2 . В качестве положительного контроля использовали СОП ХТ, в качестве отрицательного контроля – интактные клетки СНО-К1. Обнаружено отсутствие повреждающего действия ХА в разведении образцов (титр от 32 до 64), что соответствовало содержанию ХА 0,1 мг/мл.

Разработан алгоритм оценки показателей активности антигенов методами *in vitro* (рисунок 2). Применение комплекса методов *in vitro* ПЦР, РПИГ, GM_1ELISA , ДИА ЗНЧ и перевиваемой клеточной линии СНО-К1 позволяет определять иммунохимическую и биологическую активность ХТ, ХА, готовой лекарственной формы вакцины. Применение сочетания методов ПЦР и РПИГ позволяет подтвердить токсигенность штамма *V. cholerae* методами *in vitro* и на данном этапе производства вакцины отказаться от использования животных.

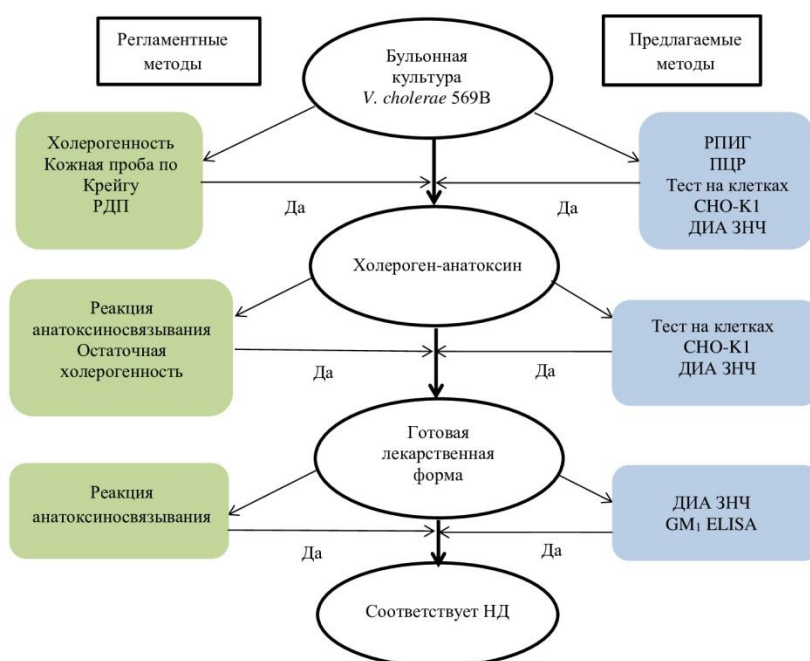


Рисунок 2 – Алгоритм использования методов *in vitro* и *in vivo* для контроля специфической активности ХТ и ХА на этапах производства холерной вакцины.

Зеленым цветом отмечены методы *in vivo*, используемые в соответствии с промышленным регламентом, голубым цветом – альтернативные методы *in vitro*

Установлены количественные критерии оценки показателей активности антигенов методами *in vitro*: содержание ХТ в реакторной культуре по РПИГ, GM₁ ELISA, ДИА ЗНЧ (реципрокный титр) не менее 8 для каждого метода, на клетках СНО-К1 – 80. Разработаны нормативные показатели качества ХА в реакции анатоксиносвязывания (нейтрализации) на клетках СНО-К1 (не менее 2 000 ЕС в 1 мг). Активность ХА в ДИА ЗНЧ должна быть не ниже 8. Активность ХА в готовой лекарственной форме в ДИА ЗНЧ должна быть не ниже 512. Специфическая безвредность ХА на клетках СНО-К1: 0,1 мг ХА не должно вызывать специфических изменений на клетках СНО-К1 (тест отрицательный).

Разработка методического подхода к контролю стабильности свойств штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов активных компонентов вакцины

На данном этапе исследования анализировали образцы субкультур производственных штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 на разных стадиях процесса культивирования: I пассаж – 19 часовая агаровая культура; II пассаж – 6 часовая бульонная культура; III пассаж – 17 часовая бульонная культура; реакторная культура – с первого по десятый часы культивирования.

Установлено, что продукция антигенов производственными штаммами начинается с ранней экспоненциальной фазы роста реакторных культур: с первого часа для О-Аг (титр ДИА ЗНЧ – 2) и с третьего часа для ХТ (титр ДИА ЗНЧ – 16), с нарастанием к середине экспоненциальной фазы. Максимальная продукция наблюдалась в стационарной фазе роста (титр ДИА ЗНЧ более 128 по каждому антигену).

Методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) на всех этапах четко визуализировались типичные вибрионы. Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) было показано, что морфометрические показатели микробных клеток штаммов-продуцентов в процессе подготовки посевного материала и культивирования остаются практически неизменными. Для штамма *V. cholerae* 569В в процессе глубинного культивирования клетки реакторной субкультуры (к 10 ч) в среднем изменили свои линейные размеры в сторону увеличения длины с $(2,4 \pm 0,1)$ мкм до $(3,51 \pm 0,2)$ мкм. Шероховатость клеточной стенки у обоих штаммов оставалась практически неизменной. В результате проведенных исследований было показано, что производственные штаммы-продуценты *V. cholerae* 569В и М-41 на всех этапах культивирования были типичными по морфологическим свойствам.

Методом полногеномного секвенирования было показано наличие комплекса генов, ответственных за синтез ХТ, О-Аг в клетках штаммов *V. cholerae* 569В и М-41, полученных на этапах производственного цикла. Анализ 20 образцов реакторной культуры штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 с первого по десятый часы культивирования методом ПЦР выявил присутствие фрагментов ДНК размером 564 н.п., соответствующих нуклеотидной последовательности *ctxA* гена. Полученные данные подтверждают стабильность геномов изученных штаммов.

В соответствии с ПР питательной средой для культивирования производственных штаммов является казеиновый бульон на основе основного раствора казеина (ОРК). Был проведен ретроспективный анализ эффективности питательной среды на основе ОРК. По выходу специфических антигенов была выявлена большая вариабельность этого показателя (до 68,6 % для О-Аг и 44,8 % для ХА).

Далее была изучена продукция антигенов при культивировании штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 на средах, приготовленных на основе сухого ферментативного гидролизата казеина (ФГК). На первом этапе в условиях малообъемного культивирования было установлено, что содержание аминного азота в среде на основе ФГК должно быть не ниже 100 мг%. Культивирование штаммов *V. cholerae* в условиях биореакторах на казеиновом бульоне на основе ОРК и ФГК (100 мг%, 150 мг%, 200 мг% аминного азота) показало, что содержание аминного азота 100 мг% приводило к уменьшению выхода биомассы на $(30,0 \pm 1,0)$ % для штамма *V. cholerae* М-41 и на $(20,0 \pm 1,0)$ % для штамма *V. cholerae* 569В по сравнению с другими вариантами. Конечные концентрации микробных клеток в бульонных культурах, выращенных на среде с ФГК (150 мг% аминного азота) и ОРК в среднем не отличались и соответствовали требованиям ПР $(50 \pm 15) \times 10^9$ м.к./мл). По результатам ДИА ЗНЧ титр специфической активности О-Аг составил $(853,3 \pm 170,6)$ для *V. cholerae* М-41 и $(682,6 \pm 170,6)$ для *V. cholerae* 569В, активность ХТ – $(682,6 \pm 170,6)$. Данные показатели превышали

аналогичные характеристики, полученные при использовании среды на основе ОРК. В частности, титр активности О-Аг у штамма *V. cholerae* М-41 составил $(213,3 \pm 42,6)$, у штамма *V. cholerae* 569В – $(170,6 \pm 42,6)$, ХТ $(384,0 \pm 128,0)$.

При сравнительном анализе протективных антигенов, полученных при культивировании на питательных средах на основе ОРК и ФГК выявлено, что выход О-Аг, выделенного при культивировании на питательной среде на основе ФГК составил в среднем $(651,6 \pm 103,4)$ г, при культивировании на питательной среде на основе ОРК $(446,3 \pm 30,7)$ г. Для ХА выход составил $(387,3 \pm 78,8)$ г и $(267,6 \pm 37,4)$ г соответственно. Специфическая активность полученных антигенов также соответствовала требованиям ПР. Результаты применения сред с различной основой при глубинном культивировании штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 представлены на рисунке 3.

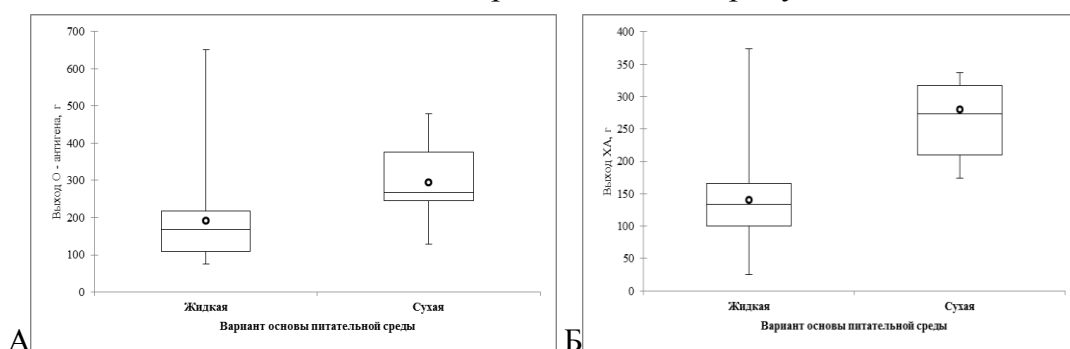


Рисунок 3 – Сравнительный анализ выхода ХА и О-Аг при культивировании *V. cholerae* М-41 (А) и 569В (Б) на питательных средах на основе жидкого и сухого гидролизатов казеина

По результатам проведенных исследований питательная среда на основе ФГК была внедрена в производство и с 2017 г применялась для культивирования штаммов-продуцентов. Проведенный ретроспективный анализ эффективности питательных сред на основе жидкого и сухого гидролизатов казеина для культивирования производственных штаммов *V. cholerae* выявил, что по показателю роста биомассы основы практически не отличались. По показателю «выход специфических антигенов» сухая основа была в 1,5 раза эффективнее, чем жидкая.

Оптимизация способа получения холерного токсина для контроля производства холерной химической вакцины

Потребность в препарате СОП ХТ в производственном цикле вакцины весьма значительна, поэтому актуальна оптимизация условий его получения. Для выделения ХТ проводили глубинное культивирование штамма *V. cholerae* 569В в лабораторном биореакторе в течение (9 ± 1) ч на среде на основе ферментативного гидролизата фибрина (ФГФ) рН 8,0, так как возможность использования данной среды была показана ранее (Антонычева М.В. и др., 2011; Никифоров А.К. и др., 2015). После стерилизующей фильтрации культуральной жидкости отделение О-Аг осуществляли методом тангенциальной ультрафильтрации с использованием мембран с номинальной отсеч-

кой по молекулярной массе (НОММ) 100 кДа (Комиссаров А.В. и др., 2015) с последующим 10-кратным концентрированием с использованием мембран с НОММ 10 кДа. Далее при постепенном понижении рН до $(4,2 \pm 0,1)$ в присутствии 0,25 % гексаметафосфата натрия из концентрата осаждали белковую фракцию, содержащую ХТ. Осадок содержал ХТ (титр в РДП – 32, в ДИА ЗНЧ – 512) и О-Аг (титр в РДП – 2). После диализа проводилась фильтрация через адсорбирующий двуслойный фильтр с положительным зарядом для удаления эндотоксинов и гель-хроматография на колонке с TSK-гелем HW-60. При анализе ХТ в SDS-PAGE с последующим иммуноблоттингом с СОП АХС выявлены специфические полосы, характерные для холерного токсина, выделенного по классическому способу (Mekalanos J.J. *et al.*, 1978). Анализ полученного ХТ показал его соответствие требованиям к СОП: содержание белка составляло (200 ± 20) мкг/мл, титр в РДП с АХС 64 (ДИА ЗНЧ 256). Активность препарата в кожной пробе по Крейгу была 40000.

Для получения ХТ была изучена возможность использования новых штаммов-продуцентов: рекомбинантных штаммов *V. cholerae* КМ68, КМ76, КМ234; природных геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор серовара Огава М-1298, М-1326, М-1328, М-344, М-1345, М-1349, М-1463, М-1509 и *V. cholerae* Р-18899 биовара Эль Тор серовара Инаба. Скрининг и контроль стабильности штаммов *V. cholerae* проводился с применением разработанного комплекса методов *in vitro*. На первом этапе методом ПЦР во всех исследованных штаммах подтверждено наличие гена *ctxA*. При скрининге природных геновариантов на среде АКІ наибольшая продукция ХТ отмечена у штаммов *V. cholerae* М-1463, Р-18899, М-1328, М-1349. Далее было проведено малообъемное культивирование четырех штаммов геновариантов, трех рекомбинантных и штамма *V. cholerae* 569В (контроль) на казеиновом бульоне и среде на основе ФГФ. Максимальная продукция ХТ наблюдалась у штаммов *V. cholerae* КМ68, КМ76, Р-18899, 569В на среде на основе ФГФ.

При культивировании штаммов в лабораторном биореакторе на среде на основе ФГФ у штамма *V. cholerae* КМ68 (рисунок 4) отмечалась наибольшая концентрация биомассы $(18,5 \pm 1,1)$ м.к. млрд/мл и активность ХТ в ДИА ЗНЧ $(426,6 \pm 85,3)$. Новым способом был выделен ХТ из штамма *V. cholerae* КМ68. Активность ХТ из штамма КМ68 в ДИА ЗНЧ $(1357,3 \pm 333,3)$ была выше активности препарата, полученного из штамма *V. cholerae* 569В $(682,6 \pm 170,6)$. Также был отмечен большой выход антигена из штамма *V. cholerae* КМ68: $(9,0 \pm 0,5)$ мг/л по сравнению с контрольным штаммом $(5,0 \pm 0,4)$ мг/л. Содержание белка составляло (200 ± 20) мкг/мл, активность ХТ в кожной пробе по Крейгу была 120000.

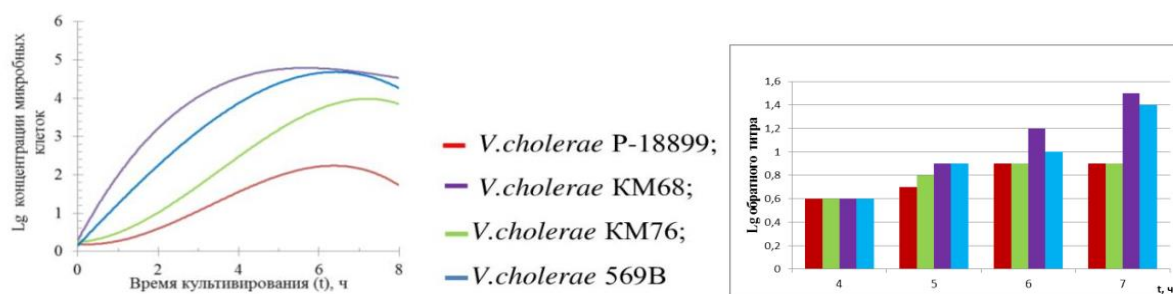


Рисунок 4 – Кривые роста (А) и динамика содержания ХТ (Б) штаммов *V. cholerae* –в биореакторе на питательной среде на основе ФГФ

В результате данного этапа исследования был разработан новый способ выделения ХТ, соответствующего СОП ХТ для контроля компонентов и готовой лекарственной формы холерной химической вакцины. При этом показана целесообразность использования штамма *V. cholerae* KM68 и культивирования на питательной среде на основе ФГФ.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненной работы разработан алгоритм по использованию методов *in vitro* для оценки специфической активности основных антигенов холерной химической вакцины. Совместное применение ПЦР и РПИГ позволяет подтвердить токсигенность штамма *V. cholerae* 569В методами *in vitro* и при контроле этого показателя на этапе культивирования отказаться от использования животных. Опытным путем доказана возможность использования тестов на клетках СНО-К1 для оценки активности ХТ и ХА. Экспериментально обоснована возможность применения ДИА ЗНЧ для оценки специфической активности О-Аг и ХТ в культуральной жидкости штаммов-продуцентов, ХА в лиофилизированном виде и в готовой лекарственной форме вакцины. Применение комплекса методов *in vitro* ПЦР, РПИГ, GM₁ELISA, ДИА ЗНЧ и тестов на клетках СНО-К1 позволяет определять иммунохимическую и биологическую активность ХТ, ХА, готовой лекарственной формы вакцины.

С использованием комплекса методов *in vitro* разработан методический подход для контроля стабильности производственных штаммов *V. cholerae* в процессе культивирования, который включает в себя следующие методы: морфологические (АСМ, ТЭМ, световая микроскопия); молекулярно-генетические (ПЦР, полногеномное секвенирование; иммунохимические (ДИА ЗНЧ). По результатам проведенных исследований были охарактеризованы производственные линии природных штаммов *V. cholerae*, используемые для изготовления холерной химической вакцины, которые депонированы в ГКПБ ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора: *V. cholerae* O1 классического биовара серовара Инаба KM2129 (569В) и *V. cholerae* O1 классического биовара серовара Огава KM2130 (М-41).

Доказана стабильность повышенной продукции антигенов штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 при культивировании на питательной среде на основе сухого гидролизата казеина. По результатам исследований данная среда внедрена в производство вакцины. Разработан способ выделения ХТ для получения СОП ХТ, используемого для контроля антигенов и готовой лекарственной формы вакцины. Замена в производстве холерной химической вакцины методов, связанных с использованием животных, на методы *in vitro* является перспективным направлением стандартизации методов контроля иммунобиологических лекарственных препаратов.

5. ВЫВОДЫ

1. Разработан универсальный методический подход на основе непрямого дот-иммуноанализа с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом, позволяющий с высокой степенью корреляции (от 0,8 до 0,9) с результатами, полученными применяемыми в настоящее время методами контроля, определять специфическую активность антигенов в компонентах и готовой лекарственной форме холерной химической вакцины.

2. Экспериментально доказана возможность замены методов *in vivo* определения специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина (холерогенность, кожная проба по Крейгу и реакция анатоксиносвязывания) на комплекс методов *in vitro* (полимеразная цепная реакция, радиальный пассивный иммунный гемолиз, дот-иммуноанализ с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом, иммуноферментный анализ с использованием GM₁-ганглиозидов), позволяющих одновременно определить иммунохимическую и биологическую активность антигенов.

3. Экспериментально обосновано применение перевиваемой клеточной линии СНО-К1 для определения специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина в производстве холерной химической вакцины на основании высокой корреляции между результатами (от 0,82 до 0,93).

4. С использованием комплекса методов (атомно-силовая микроскопия и трансмиссионная электронная микроскопия, полногеномного секвенирования, дот-иммуноанализ с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом, радиальный пассивный иммунный гемолиз) на всех этапах культивирования получены новые информативные характеристики культурально-морфологических свойств и показана стабильность нуклеотидных последовательностей полного генома штаммов *Vibrio cholerae* 569В и М-41 на всех стадиях производственного цикла, позволившие рекомендовать альтернативный подход к оценке стабильности штаммов-продуцентов.

5. Установлено, что применение сухой основы питательной среды – ферментативного гидролизата казеина в количестве 150 мг% по аминному азоту обеспечивает стандартные условия для глубинного культивирования производственных штаммов *Vibrio cholerae* 569В и М-41 и способствует стабильному увеличению в 1,5 раза выхода протективных антигенов, по сравнению со средой на основе основного раствора казеина.

6. Определены условия максимальной продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* при культивировании в условиях биореактора (штамм-продуцент *Vibrio cholerae* КМ68, среда культивирования на основе ферментативного гидролизата фибрина). Разработан новый способ выделения холерного токсина, включающий ультрафильтрацию, ЛПС-адсорбцию, гель-хроматографию на TSK-геле HW-60, использование которого позволяет исключить стадии ионообменной хроматографии и диализа, снизить временные затраты с (47±5) до (26±6) ч и получить холерный токсин, соответствующий нормированным требованиям (специфическая активность в каждой пробе не менее 1:16000 и содержание белка по Лоури (200±20) мкг/мл). Показана возможность его использования для изготовления стандартного образца предприятия «Тест-токсин холерный».

6. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Внедрение новых методических подходов для определения специфической активности основных активных компонентов вакцины и стабильного сохранения исходных параметров штаммами-продуцентами в производство «Вакцины холерной бивалентной, таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой» позволит оптимизировать процесс производства, уменьшить временные и материальные затраты.

2. Предложенный комплекс методов *in vitro* может быть использован при разработке, производстве и контроле качества холерных вакцин.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Гаева, А.В. Современные подходы к контролю активных компонентов холерной химической вакцины/ А.В. Гаева, О.В. Громова, О.С. Дуракова, С.В. Генералов, О.А. Волох // Разработ. Регистр. Лекарств. Средств. – 2018. – №1 (22). – С. 30-35. Статья (ВАК).

2. Воробьева, С.А. Возможность определения специфической активности О-Аг в производстве холерной химической вакцины с помощью дот-анализа / С.А. Воробьева, **О.С. Дуракова**, О.А. Волох, О.В. Громова // Изв. Саратовск. Универ. Нов. серия. Сер. Хим. Биол. Экол. – 2018. – Том. 18. – Вып. 3. – С. 318-319. Статья (ВАК).

3. **Дуракова, О.С.** Применение дот-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины / **О.С. Дуракова**, О.В. Громова, М.Н. Киреев, С.А. Воробьева, О.Д. Клокова, Л.Ф. Ливанова, Н.И. Белякова, О.А. Волох // Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. Овчинникова. – 2018. – Том. 14. – №4. – С. 10-13. Статья (ВАК).

4. Белякова, Н.И. Использование питательной среды на основе сухого гидролизата казеина в производстве бивалентной химической вакцины / 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 // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2019. – №4. – С. 26-30. Статья (ВАК).

5. **Дуракова, О.С.** Экспериментальное обоснование возможности использования перевиваемой линии клеток СНО-К1 для определения специфической активности компонентов холерной химической вакцины / **О.С. Дуракова**, О.В. Громова, А.В. Гаева, С.В. Генералов, Л.Ф. Ливанова, О.Д. Клокова, О.А. Волох // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2019. – № 4. – С. 113-116. Статья (ВАК).

6. Гаева, А.В. Определение специфической активности компонентов холерной химической вакцины с использованием культуры клеток / А.В. Гаева О.В. Громова, **О.С. Дуракова**, С.В. Генералов, Л.Ф. Ливанова, О.А. Волох // Биотехнология. – 2020. – Том 36. – №3. – С. 82-89 Статья (Scopus).

7. Киреев, М.Н. Изучение свойств холерного токсина и его дериватов в системе разработки новых вакцинных препаратов / М.Н. Киреев, О.В. Громова, О.С. Дуракова, С.А. Воробьева, Л.Ф. Ливанова, О.А. Волох // Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. Овчинникова. – 2022. – Т. 18. – № 1. – С. 33-37. Статья (ВАК).

8. **Дуракова, О.С.** Изучение стабильности свойств штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов активных компонентов холерной химической вакцины / О.С. Дуракова, С.А. Воробьева, А.В. Гаева, Я.М. Краснов, О.С. Кузнецов, П.С. Ерохин, О.В. Громова, О.А. Волох // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2022. – № 2. – С. 70-74. Статья (ВАК).

9. Воробьева, С.А. Антигенные компоненты холерной бивалентной химической вакцины, методы их выделения и контроля / С.А. Воробьева, **О.С. Дуракова**, О.В. Громова, О.А. Волох, О.Д. Клокова, А.К. Никифоров // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2022. – № 2. – С. 12-19. Статья (ВАК).

Патенты:

1. Патент на изобретение № 2799574 Российская Федерация. Способ получения холерного токсина для контроля производства холерной химической вакцины / О.В. Громова, М.Н. Киреев, О.С. Дуракова, Л.Ф. Ливанова, А.В. Гаева, С.А. Воробьева, О.А. Волох. Заявитель и правообладатель ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Опубл. 06.07.2023 г. Бюл. № 19.

Прочие публикации.

1. Громова, О.В. Получение экспериментальной серии холерной химической вакцины с использованием питательной среды на основе сухого гидролизата казеина / О.В. Громова, Ю.А. Алешина, Л.Ф. Ливанова, **О.С. Дуракова**, А.Ю. Ульянов, Н.И. Белякова, О.Д. Клокова, О.А. Волох, М.В. Антонычева // XIII Межгос. науч.-практ. конф. «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года». – 2016. – г. Саратов – С. 74-76.
2. Гаева, А.В. Определение активности холерного токсина при выращивании производственного штамма *Vibrio cholerae* 569В методами *in vitro*/ А.В. Гаева, О.В. Громова, **О.С. Дуракова**, С.В. Генералов, О.А. Волох// Мат. II Всерос. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных». – 5-6 апреля 2017. – г. Ставрополь. – С. 308-309.
3. **Дуракова, О.С.** Применение дот-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины/ **О.С. Дуракова**, О.В. Громова, Л.Ф. Ливанова, Н.Г. Авдеева, Ю.И. Самохвалова, А.А. Николаев, А.В. Гаева, М.Н. Киреев, О.А. Волох // Акт. вопр. Биомед. инженерии: сб. мат. VII Всерос. науч. конф. для молодых учен. – 23 окт.-11 дек. 2017. – г. Саратов. – С. 10-12.
4. **Дуракова, О.С.** Оптимизация условий получения холерного токсина/ **О.С. Дуракова**, А.В. Гаева, Л.Ф. Ливанова, О.В. Громова, О.А. Волох// Мат. XI съезда Всерос. науч.-практ. о-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения». – 16-17 ноября 2017. – г. Москва. – С. 427-428.
5. Киреев, М.Н. Способ получения очищенного холерного токсина на высокотехнологическом оборудовании/ М.Н. Киреев, О.В. Громова, А.В. Гаева, Л.Ф. Ливанова, **О.С. Дуракова**, О.А. Волох// Мат. XI съезда Всерос. науч.-практ. о-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения». – 16-17 ноября 2017. – г. Москва. – С. 433.
6. **Дуракова, О.С.** Использование дот-анализа для определения специфической активности антигенов во фракциях и таблетках холерной вакцины/ **О.С. Дуракова**, О.В. Громова, С.А. Воробьева, М.Н. Киреев, Л.Ф. Ливанова, О.Д. Клокова, Н.А. Шарапова, О.А. Волох // 22-ая Междунар. Пушкинская школа-конф. молодых учен. «Биология – наука XXI века». – 23-27 апр. 2018. – г. Пущино. – С. 75-76.
7. **Дуракова, О.С.** Совершенствование методов контроля специфической активности антигенов готовой лекарственной форме холерной химической вакцины/ **О.С. Дуракова**, О.В. Громова, С.А. Воробьева, М.Н. Киреев, О.А. Волох// Обеспечение сан.-эпид. благополучия в государствах-участниках СНГ: сб. мат. XIV Межгос. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». – 20-21 ноября 2018. – г. Саратов. – С. 122-124.
8. Гаева А.В. Оценка активности холерного токсина при производстве холерной химической вакцины на модели перевиваемой линии клеток СНО-К1/ А.В. Гаева, С.В. Генералов, **О.С. Дуракова**, О.В. Громова, Л.Ф. Ливанова, О.А. Волох// Обеспечение сан.-эпид. благополучия в государствах-участниках СНГ: сб. мат. XIV Межгос. науч.-практ. конф., посв. 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». – 20-21 ноября 2018. – г. Саратов. – С. 99-101.
9. **Дуракова, О.С.** Современные подходы к выделению и очистке холерного тест-токсина / **О.С. Дуракова**, О.В. Громова, Л.Ф. Ливанова, Н.Г. Авдеева, Ю.И. Самохвалова, А.В. Гаева, М.Н. Киреев, О.А. Волох // Бактериология. – 2018. – Т. 3. – № 1. – С. 59-62.
10. **Дуракова, О.С.** Скрининг штаммов *Vibrio cholerae* по показателю активности холерного токсина методами *in vitro* / **О.С. Дуракова**, О.В. Громова, М.Н. Киреев, С.А. Воробьева, О.Д. Клокова, Л.Ф. Ливанова, Н.И. Белякова, О.А. Волох // 22-ая Междунар. Пушкинская школа-конф. молодых учен. «Биология – наука XXI века». – 15-19 апреля 2019. – г. Пущино. – С. 211.
11. Воробьева С.А. Оценка возможности использования прямого варианта дот-иммуноанализа для определения специфической активности полуфабрикатов холерной бива-

лентной химической вакцины / С.А Воробьева, **О.С. Дуракова**, М.Н. Киреев, О.А. Волох, О.Д. Клокова // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: мат. XI Всерос. науч.-практ. конф. молодых учен. и спец. Роспотребнадзора. – 2-4 октября 2019. – г. Уфа. – С 212-215.

12. **Дуракова, О.С.** Сравнительный анализ штаммов *V.cholerae* – продуцентов холерного токсина по показателю специфической активности методами *in vitro* / **О.С. Дуракова**, С.А. Воробьева, О.В. Громова, А.В. Гаева, Е.З. Попова, О.А. Волох // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: мат. XII Всерос. научно-практ. конф. молодых учен. и спец. Роспотребнадзора (Ростов-на-Дону, 21-22 октября 2020 г.) – Ростов-на-Дону. – 2020. – С. 325-326.

13. Воробьева, С.А. Перспективы использования методов *in vitro* для контроля специфической активности холерной бивалентной химической вакцины / С.А. Воробьева, **О.С. Дуракова**, А.В. Гаева, О.В. Громова, О.А. Волох // Эпид. надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы. Сб. науч. трудов Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посв. 100-летию академика И.Н. Блохиной – Н. Новгород: Изд-во «Медиаль». – 2021. – С. 420.

14. **Дуракова, О.С.** Анализ стабильности штаммов-продуцентов протективных антигенов *V. cholerae* / **О.С. Дуракова**, С.А. Воробьева, А.В. Гаева, О.В. Громова, О.С. Кузнецов, П.С. Ерохин, О.А. Волох // XIII Всерос. науч.-практ. конф. молодых учен. и спец. Роспотребнадзора. – 15-17 сент. 2021. – г. Екатеринбург. – С. 250-252.

15. **Дуракова, О.С.** Анализ стабильности геномов штаммов-продуцентов активных компонентов холерной химической вакцины/ **О.С. Дуракова**, С.А. Воробьева, А.В. Гаева, О.В. Громова, Я.М. Краснов, О.А. Волох// Сб. мат. конгр. с междунар. участием «Мол. диагностика и биобезопасность-2022».–27-28 апреля 2022.–г. Москва.–С. 59.

16. Воробьева, С.А. Экспериментальное обоснование возможности применения молекулярно-генетических методов на этапах производства холерной химической вакцины / С.А. Воробьева, А.В. Гаева, **О.С. Дуракова**, О.А. Волох // Сб. мат. конгр. с междунар. участием «Мол. диагностика и биобезопасность-2022». – 27-28 апреля 2022. – г. Москва. – С. 45.

ОСНОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АСМ	атомно-силовая микроскопия
ДИА ЗНЧ	дот-иммуноанализ с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом
ЕС	единицы связывания холерогена-анатоксина с сывороткой
НД	нормативная документация
О-Аг	О-антиген
ОРК	основной раствор казеина
ПР	Промышленный Регламент
РДП	реакция диффузионной преципитации по Оухтерлони
РНГА	реакция непрямой гемагглютинации
РПИГ	реакция пассивного иммунного гемолиза
СОП АХС	Стандартный образец предприятия «Сыворотка антихолерогенная кроличья»
СОП ХТ	Стандартный образец предприятия «Тест-токсин холерный»
ТЭМ	трансмиссионная электронная микроскопия
ФГК	ферментативный гидролизат казеина
ФГФ	ферментативный гидролизат фибрина
ХА	холероген-анатоксин
ХТ	холерный токсин
GM ₁ ELISA	иммуноферментный анализ с использованием ганглиозидов GM ₁
ОПобр	оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом