

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ «МИКРОБ»**

На правах рукописи

Дуракова Оксана Сергеевна

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

1.5.11 – Микробиология

1.5.6 – Биотехнология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
кандидат медицинских наук,
доцент Громова О.В.,
кандидат биологических наук
Волох О.А.

Саратов – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1 Современные средства специфической профилактики холеры и	18
международные стандарты их качества	18
1.2 Основные протективные антигены холерного вибриона и способы оценки их специфической активности	28
1.3 Требования к стабильности бактериальных штаммов, используемых в производстве иммунобиологических препаратов	38
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
2.1 Материалы	44
2.1.1 Бактериальные штаммы.....	44
2.1.2 Питательные среды и реактивы	46
2.1.3 Лабораторные животные	47
2.1.4 Клеточные линии.....	48
2.2 Методы исследования	48
2.2.1 Микробиологические методы	48
2.2.2 Биотехнологические методы.....	50
2.2.3 Биологические методы.....	51
2.2.4 Биохимические методы	53
2.2.5 Иммунохимические методы.....	54
2.2.6 Молекулярно-генетические методы.....	56
2.2.7 Статистическая обработка результатов	57

ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСА МЕТОДОВ <i>IN VITRO</i> ДЛЯ КОНТРОЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИГЕНОВ НА ЭТАПАХ ПРОИЗВОДСТВА ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ	59
3.1 Разработка способа применения иммунохимических и молекулярно-генетических методов для определения специфической активности холерного токсина, холероген-анатоксина и О-антигена	59
3.2 Экспериментальное обоснование использования перевиваемых клеточных линий для контроля специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина	73
3.3 Разработка алгоритма комплексного методического подхода <i>in vitro</i> для контроля специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина.....	83
ГЛАВА 4 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИЧЕСКОГО ПОДХОДА К КОНТРОЛЮ СТАБИЛЬНОСТИ СВОЙСТВ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> – ПРОДУЦЕНТОВ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ВАКЦИНЫ.....	87
4.1 Изучение стабильности свойств штаммов <i>Vibrio cholerae</i> 569В и <i>Vibrio cholerae</i> М-41 в условиях производственного цикла.....	87
4.2 Экспериментальное обоснование применения питательной среды на основе сухого ферментативного гидролизата казеина для глубинного культивирования штаммов <i>Vibrio cholerae</i> 569В и <i>Vibrio cholerae</i> М-41	96
ГЛАВА 5 ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ..	108
5.1 Выделение холерного токсина с использованием технологии ультрафильтрации.....	108
5.2 Применения комплекса методов <i>in vitro</i> для проведения скрининга штаммов <i>Vibrio cholerae</i> – продуцентов холерного токсина	113

5.3 Анализ препаратов холерного токсина, полученных по новой технологии	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
ВЫВОДЫ	137
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	139
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	140
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	142
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	169
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	171
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	172

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В настоящее время заболеваемость холерой в мире представляет серьезную угрозу общественному здравоохранению. Распространение холеры в странах Азии, Африки и Латинской Америки, а также развитие международных торговых, туристических, миграционных процессов определяет возникновение эпидемий и возможность заноса возбудителя в другие страны, включая Российскую Федерацию. По оценкам исследователей, во всем мире ежегодно происходит от 1,3 до 4,0 млн случаев заболевания холерой и до 143 000 случаев смерти. В 2022 г. зарегистрирован 1209301 случай холеры в 36 странах мира. По мнению экспертов в 2023 г. сохраняются риски завоза инфекции на территорию РФ, связанные с активацией эпидемического процесса в странах Азии, Африки и регионе Карибского бассейна [Москвитина Э.А. и др., 2019, 2020; Носков А. К. и др., 2022, 2023; Ali M. *et al.*, 2015; Davis W. *et al.*, 2018; WHO 2018, 2019, 2020; <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437> (дата обращения 30.03.2023)].

Официальная стратегия ВОЗ предполагает использование оральных холерных вакцин в качестве дополнительной меры предотвращения возникновения эпидемий холеры и рекомендует их применение для контингента с повышенным риском заражения (население лагерей беженцев, лиц без определенного места жительства и т.д.), а также путешественников [WHO 2010, 2017]. В настоящее время за рубежом существуют преквалифицированные ВОЗ оральные вакцины против холеры: Dukoral (SBL, Швеция), Shanchol (Shantha Biotechnics, Индия), Euvichol и Euvichol-Plus (EuBiologics, Южная Корея). Все они являются цельноклеточными, инактивированными, требуют двукратной вакцинации. Специфическую активность основных компонентов, входящих в состав перечисленных вакцин, определяют с помощью иммуноферментного анализа. Иммуноферментный анализ для количественного определения содержания антигена O1 ЛПС в готовых вакцинах и метод GM₁ ELISA для определения В-субъединицы были первоначально внедрены в начале 1990-х годов для характеристики вакцины Dukoral. С тех пор такие

тесты используются как производителями оральных холерных вакцин, так и национальными регулирующими органами для контроля в процессе производства вакцин и в качестве индикатора стабильности в течение срока годности продукта [Levine M.M. *et al.*, 2017; Cabrera A. *et al.*, 2017; Odevall L. *et al.*, 2019].

В России вакцинация против холеры включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям [Приказ Минздрава РФ № 1122н]. В нашей стране разработана, зарегистрирована и выпускается «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой», производства ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, которая является единственным препаратом для профилактики холеры в Российской Федерации. Отечественная холерная вакцина является оральной химической и состоит из холерогена-анатоксина (ХА), который получают в результате формоловой детоксикации холерного токсина (ХТ), и О-антигенов (О-Аг) холерного вибриона сероваров Инаба и Огава [Бургасов В.Н. и др., 1979; Джапаридзе М.Н. и др., 1981,1982,1993; Онищенко Г.Г. и др., 2011, 2016]. В отличие от зарубежных инактивированных вакцин, применение холерной химической вакцины предполагает однократную вакцинацию. По эффективности отечественная вакцина не уступает широко применяемой во всем мире оральной холерной вакцине Dukoral [Щуковская Т.Н. и др., 2009]. Для изготовления холерной химической вакцины используют штаммы холерных вибрионов О1 серогруппы – *Vibrio cholerae cholerae* 569В серовара Инаба и *Vibrio cholerae cholerae* М-41 серовара Огава. Обязательным этапом контроля антигенов является качественная и количественная характеристика содержания ХТ и О-Аг в бульонной культуре при глубинном культивировании штаммов *V. cholerae*. В соответствии с Промышленным Регламентом (ПР), определение токсигенности культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569В и содержания в ней ХТ по показателю «специфическая активность» методом кожной пробы по Крейгу проводится на лабораторных животных – кроликах-сосунках и взрослых кроликах, соответственно. Контроль специфической активности ХА также проводят методами *in vivo* с использованием лабора-

торных животных: взрослых кроликов (реакция анатоксиносвязывания) и кроликов-сосунков (остаточная холерогенность).

Определяющую роль в получении качественного продукта микробного синтеза играют питательные среды, эффективность которых оценивается по выходу биомассы [Еремин С.А. и др., 2013]. Вопрос стабильно высокой продукции антигенов на используемых питательных средах чрезвычайно важен и требует дополнительных критериев оценки эффективности культивирования, таких как выход «целевого продукта» – антигенных компонентов.

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 *V. cholerae* 569В серовара Инаба и *V. cholerae* М-41 серовара Огава с 1995 г. используются на этапе получения антигенов холерного вибриона, сохраняя свои основные культурально-морфологические свойства, физиологические и продуктивные параметры, но с учетом возможностей современных технологий, включающих методы оценки молекулярно-генетических структур (полногеномное секвенирование, ПЦР) и целого ряда морфометрических характеристик, представляет интерес и будет информативным применение современных методов для оценки штаммов-продуцентов [Челдышова Н.Б. и др., 2015; Ерохин П.С. и др., 2016; Уткин Д.В. и др., 2012, 2019; Hartmann M. et al., 2010].

В соответствии с рекомендациями ВОЗ, на современном этапе развития производства иммунобиологических лекарственных препаратов актуальной задачей является усовершенствование имеющихся и разработка новых, 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; Viviani L. et al., 2020].

Для определения специфической активности ХТ широко апробированным является вариант метода иммуноферментного анализа (ИФА) – GM₁ ELISA, который применяется для тестирования зарубежных вакцин [Svennerholm A.M.,

Wiklund G., 1983]. Коллективом авторов [Федорова В.А. и др., 2000] была изучена возможность применения дот-иммуноанализа (ДИА) для контроля активности ХТ при культивировании штаммов *V. cholerae*. На основе моноклональных антител к В-субъединице ХТ был предложен вариант ДИА для идентификации токсигенных штаммов холерного вибриона [Девдариани З.Л. и др., 1999]. На основе GM₁-ганглиозидов для обнаружения токсинпродуцирующих штаммов *V. cholerae* также разработан GM₁-дот-ИФА [Маркина О.В. и др., 2011]. Для диагностики и идентификации холерного вибриона в институте «Микроб» выпускаются иммуноферментные и молекулярно-генетические тест-системы, среди которых – тест-система для определения холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* – ИФАХолХТ-М (№ РЗН 2016/5013) [Михеева Е.А. и др., 2017] и тест-система для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом ПЦР (ГенХол) (№ ФСР 2007/00100). В настоящее время в производстве холерной химической вакцины для контроля свойств производственных штаммов по признаку «токсигенность» используется тест-система для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом ПЦР (ГенХол).

Для выявления продукции ХТ штаммами *V. cholerae* используют метод радиального пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) [Шагинян И.А., Маракуша Б.Н., 1983; Bramucci M.G., Holmes R.K., 1978]. В литературных источниках приводятся результаты исследований, свидетельствующие о возможности использования клеточных культур для тестирования как ХТ, так и липополисахаридсодержащих антигенов [Сальникова О.И., 1994; Маркина О.В. и др., 2007; Капер J.B., 1995]. В частности, анализ токсичности антигенов на клеточных культурах осуществляется с использованием овариальных клеток китайского хомячка СНО-К1 и почечных клеток африканских зеленых мартышек Vero [Фрешни Р.Я., 2010; Пименова Е.В., 2015, 2016; Walum E., Ekwall B., 2000; Алексеева Л.П. и др., 2019].

Во всех этих тестах, а также для получения стандартного образца предприятия «Сыворотка антихолерогенная кроличья» (СОП АХС), используемого для постановки иммунохимических анализов и биологических тестов на этапах производства холерной химической вакцины, используется СОП «Тест-токсин холер-

ный» (СОП ХТ). Выделение ХТ является многостадийным и трудоемким процессом, который проводится по методу J.J. Mekalanos [Mekalanos J.J. *et al.*, 1978]. Актуальной является разработка новых, более экономичных методических подходов получения препарата ХТ, соответствующего требованиям к СОП ХТ.

На данный момент оценку активности О-Аг на этапе получения и в готовой лекарственной форме холерной химической вакцины проводят с помощью реакции диффузионной преципитации (РДП) и реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). В работе Сыровой Н.А. [Сырова Н.А., 2005] предложено определение активности О-Аг в процессе масштабного культивирования производственных штаммов холерного вибриона в ДИА с применением поликлональных антител. Была изучена возможность применения ДИА для контроля синтеза О-Аг штаммами *V. cholerae* [Федорова В.А. и др., 2000].

Актуальной задачей в производстве холерной химической вакцины является замена методов определения специфической активности антигенов с использованием лабораторных животных на высокочувствительные, воспроизводимые методы *in vitro* и разработка способов контроля стабильности штаммов-продуцентов. К настоящему времени отсутствуют сведения о применимости существующих и разработанных ранее иммуноферментных и молекулярно-генетических тест-систем для контроля стабильности штаммов-продуцентов и специфической активности антигенов *V. cholerae* в условиях цикла производства холерной химической вакцины.

Все вышеизложенное определило цель и задачи работы.

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 культураль-

но-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 Росский 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 следующие нормативно-методические документы учрежденческого уровня внедрения:

1. «Методические рекомендации по определению активности холерного токсина в процессе производства холерной химической вакцины методами иммуноферментного анализа и радиального пассивного иммунного гемолиза» (одобрены Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 6 от 22.12.2016 г.).

2. «Методические рекомендации по применению ДОТ-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины» (одобрены Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 5 от 19.12.2017 г.) – акт внедрения от 14.06.2023 г. (Приложение 1).

3. «Методические рекомендации по использованию культуры клеток для анализа активности холерного токсина на этапах производства компонентов холерной химической вакцины» (одобрены Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 8 от 7.12.2018 г.) – акт внедрения от 14.06.2023 г. (Приложение 1).

4. «Методические рекомендации по определению специфической активности компонентов холерной вакцины с использованием культуры клеток» (одобрены Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 4 от 8.11.2019 г.) – акт внедрения от 14.06.2023 г. (Приложение 1).

Методология и методы исследования

Основными объектами исследования послужили штаммы *V. cholerae* классического и Эль Тор биоваров, антигены холерного вибриона и лекарственный препарат «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой». Предметом исследования явились методы *in vitro*

для контроля специфической активности антигенов холерного вибриона и контроля стабильности штаммов *V. cholerae*. Теоретической базой работы явились исследования российских и зарубежных ученых, материалы нормативной документации по контролю специфической активности холерного токсина, холерогена-анатоксина и О-антигена. При выполнении работы применяли микробиологические, биотехнологические, биологические, иммунохимические, молекулярно-генетические и статистические 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 исследования, соответствующих цели и задачам работы. Эксперименты проведены с использованием оборудования и контрольно-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 Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018; 2019); XIV Межгосударственной научно-практической конференции, посвященной 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ» (Саратов, 2018); конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022» (Москва, 2022); VII Всероссийской научной конференции молодых ученых «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 молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Уфа, 2019); XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Ростов-на-Дону, 2020); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной «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 при-

кладных исследований в РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2017; 2018; 2019; 2020; 2021; 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 сотрудниками других отделов: к.б.н. Кузнецовым О.С. (трансмиссионная электронная микроскопия); к.ф.-м.н. Ерохиным П.С. (атомно-силовая микроскопия); к.х.н. Красновым Я.М. (полногеномное секвенирование); к.б.н. Генераловым С.В. (подготовка клеточных линий). Автор выражает благодарность сотрудникам отделов профилактических препаратов, микробиологии, диагностических препаратов, питательных сред, биологического и технологического контроля, экспериментальных животных с виварием ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора за консультативно-методическую помощь при выполнении отдельных этапов диссертационной работы.

Связь работы с научными программами.

Работа выполнена в лаборатории холерных вакцин отдела профилактических препаратов ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора в период с 2016 по 2022 гг. в рамках отраслевых 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 пре-

паратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (номер госрегистрации АААА-А21-121012090066-4).

Публикация научных трудов.

По материалам диссертационной 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 и условных обозначений, списка литературы, состоящего из 235 источников, из которых 99 отечественных и 136 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 26 рисунками и 21 таблицей.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные средства специфической профилактики холеры и международные стандарты их качества

Холера – острая бактериальная инфекционная болезнь с фекально-оральным механизмом передачи, характеризующаяся диарейным синдромом, обезвоживанием (дегидратацией) и нарушением водно-солевого обмена. Возбудитель холеры относится к виду *Vibrio cholerae* рода *Vibrio* семейству *Vibrionaceae* [Chatterjee S. *et al.*, 2007; Harris J.V. *et al.*, 2012; Lutz C. *et al.*, 2013]. Возбудителями холеры являются эпидемически значимые холерные вибрионы O1 серогруппы классического и Эль Тор биоваров, а также *V. cholerae* O139 серогруппы, содержащие гены холерного токсина (*ctxAB+*) и токсинкорегулируемых пилей (*tcpA+*) [Литусов Н.В., 2013; Москвитина Э.А. и др., 2016; Clemens J. D., *et al.*, 2017; Deen J. *et al.*, 2020].

По данным ВОЗ во всем мире ежегодно регистрируются от 1,3 до 4,0 млн случаев заболевания холерой и до 143 000 случаев смерти [Ali M. *et al.*, 2015]. Основная нагрузка лежит на странах с ограниченными ресурсами (санитарно-гигиенические условия, скученность и миграция населения). Крупные вспышки холеры были описаны в Африке, Южной Азии и Юго-Восточной Азии [Reidl J. *et al.*, 2002; Sack D.A. *et al.*, 2006; Dutta D. *et al.*, 2013; Lippi D. *et al.*, 2016; Piarroux R. *et al.*, 2017; Somboonwit Ch. *et al.*, 2017; Hsueh B.Y. *et al.*, 2019; Deen J. *et al.*, 2020; Balasubramanian D. *et al.*, 2021].

Глобальная ситуация по холере с конца 2022 года продолжает ухудшаться. Наблюдается активный рост заболевания, который отличается количеством, масштабом и одновременно многочисленными вспышками в странах, которые были неэндемичные или свободны от холеры в течение десятилетий, и высокими показателями смертности [<https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437> (дата обращения 30.03.2023)]. Продолжающиеся эпидемические вспышки и крупные эпидемии холеры наносят значительный социаль-

но-экономический ущерб и свидетельствуют о том, что данное заболевание остается одной из приоритетных проблем мирового здравоохранения. Сформированные эндемичные очаги представляют реальную угрозу выноса инфекции за их пределы. Активизация миграционных процессов, увеличение товарооборота, наличие общих границ с неблагополучными по холере странами – все это определяет реальную возможность заноса этой инфекции на территорию РФ [Москвитина Э.А. и др., 2020; Носков А. К. и др. 2022]. Ситуация по холере осложняется происходящими в мире природными и техногенными катастрофами [Leung D.T. *et al.*, 2012; Piarroux R. *et al.*, 2012; Orata F.D. *et al.*, 2014; Balakrishnan V.Sh., 2017; Rabaan, A.A., 2019]. Эпидемии холеры серьезно истощают ресурсы национальных и местных органов общественного здравоохранения [Mogasale V. *et al.*, 2020]. Неустойчивая эпидемиологическая обстановка по холере в мире и возможные случаи заноса заболевания в РФ определяют необходимость разработки и производства современных и надежных национальных средств и методов специфической иммунопрофилактики холеры. Согласно официальной стратегии ВОЗ для предотвращения возникновения эпидемий холеры вне эндемичных территорий рекомендуется использование оральных холерных вакцин для вакцинации контингентов с высоким риском инфицирования (население лагерей беженцев, лиц без определенного местожительства и т.д.), а также путешественников [Bishop A.L. *et al.*, 2011; Kanungo S. *et al.*, 2022].

Вакцинация против холеры является действенным методом профилактики. Оральные вакцины против холеры в последние годы используются для снижения интенсивности сезонных заболеваний в эндемичных районах, защиты таких групп высокого риска населения, как беженцы, помещенные в лагеря в эндемичных по холере районах, и защищают путешественников из стран, благополучных по холере. Предлагаемые ВОЗ рекомендации по использованию оральных холерных вакцин в эндемичных очагах холеры предполагают их применение в комплексе с мероприятиями, предусмотренными существующей в мире системой контроля над холерой [Parker L.A. *et al.*, 2017; Ganesan D. *et al.*, 2020; Pezzoli L., 2020]. Глобальная целевая программа «Ликвидация холеры: дорожная карта до 2030 г.»

предусматривает сокращение смертности от холеры на 90% не менее чем в 20 странах. Глобальная дорожная карта акцентирует внимание на комплексном подходе к борьбе с холерой и выделяет стратегически важный аспект – применение холерных вакцин [<https://www.who.int/ru/news/item/03-10-2017-partners-commit-to-reduce-cholera-deaths-by-90-by-2030> (дата обращения 30.03.2023)].

В настоящее время за рубежом существуют три преквалифицированные ВОЗ пероральные вакцины против холеры: Dukoral (SBL, Швеция), Shanchol (Shantha Biotechnics, Индия), Euvichol (EuBiologics, Южная Корея). Все они предполагают двукратную вакцинацию [Schaetti Chr. *et al.*, 2012; Charles R.C. *et al.*, 2014; Wierzba Th.F. *et al.*, 2019; Shaikh H., 2020]. Дефицит вакцин против холеры на фоне подъема заболеваемости во всем мире вынуждает временно отказаться от двухдозовой схемы профилактики, перейдя вместо этого к однодозовой схеме [<https://www.who.int/ru/news/item/19-10-2022-shortage-of-cholera-vaccines-leads-to-temporary-suspension-of-two-dose-strategy--as-cases-rise-worldwide> (дата обращения 30.03.2023)].

Вакцина Dukoral (Швеция) представляет собой четырехвалентную оральную вакцину, состоящую из инактивированных формалином или нагреванием клеток штаммов *V. cholerae* O1 серовара классического и Эль Тор биоваров ($31,25 \times 10^9$ КОЕ на дозу) и рекомбинантной В-субъединицы ХТ (1 мг на дозу). Вакцина Dukoral была первой оральной противохолерной вакциной, получившей международную лицензию в 1991 г. Она лицензирована в более чем 60 странах и предназначена для путешественников и применения в эндемичных районах; использовалась в Индонезии, Судане, Уганде и в эндемичных районах Мозамбика. Представляет собой суспензию в комплекте с гранулами шипучими для приготовления раствора для приема внутрь. Предназначена для людей в возрасте ≥ 2 года в количестве 2 доз с интервалом от 7 до 14 дней (3 дозы для детей от 2 до 5 лет) [Dembiński Ł. *et al.*, 2021].

Вакцина Shanchol (Индия) создавалась на основе вакцины Dukoral. Она содержит инактивированные нагреванием или формалином клетки штаммов *V. cholerae* O1 и O139 сероваров классического и Эль Тор биоваров

($2,5 \times 10^{10}$ КОЕ), не содержит В-субъединицу. В 2011 году вакцина Shanchol была сертифицирована ВОЗ. Предназначена для людей в возрасте от 1 года и старше в количестве 2 доз с интервалом 14 дней. Препарат разрабатывался специально для применения в развивающихся странах в рамках программ по иммунизации населения и применялся во время вспышек холеры на Гаити и в Гвинее. Также вакцина включена в программы иммунизации в Бангладеш и индийском штате Одиша [Islam Md.T. *et al.*, 2020].

Вакцины Euvichol и Euvichol Plus (Южная Корея) – пероральные вакцины против холеры, которые содержат холерные вибрионы серотипов O1 и O139, инактивированные нагреванием или формалином. Предназначены для людей в возрасте 1 года и старше в количестве 2 доз с интервалом 14 дней [Odevall L. *et al.*, 2018].

Все вышеперечисленные преквалифицированные инактивированные вакцины предназначены для вакцинации контингентов с повышенным риском заражения, а также путешественников в эндемичные по холере стран.

Глобальным альянсом по вакцинам и иммунизации (Global Alliance for Vaccines and Immunisation) был создан запас холерных вакцин Shanchol и Euvichol, прошедших предварительную квалификацию ВОЗ. В 2018 г. в одиннадцать стран было отправлено почти 18 млн доз пероральной вакцины против холеры при чрезвычайных ситуациях в эндемичных по холере странах с низким уровнем дохода [Weil A.A. *et al.*, 2018; WHO, 2018, 2019, 2020; Wierzba Th.F. *et al.*, 2019; Pezzoli L., 2020; Shaikh H. *et al.*, 2020].

Национальные вакцины:

Вакцина mORC-VAX (Вьетнам) создана на основе Dukoral, но дополнена инактивированными нагреванием клетками вибрионов O139 серогруппы. Выпускается в форме суспензии. Предназначена для взрослых и детей от 1 года для двукратной вакцинации с интервалом 14 суток [WHO, 2010].

Вакцина OraVacs (Китай) содержит инактивированные клетки *V. cholerae* O1 серогруппы – $5,0 \times 10^{10}$ КОЕ и рекомбинантную В-ХТ – 1 мг на дозу. Выпуска-

ется в форме капсул. Предназначена взрослым и детям от 11 лет по 3 капсулы с интервалом 0-7-28 суток [WHO, 2010].

В Народной Республике Бангладеш выпускается местная пероральная вакцина против холеры Cholvaх (Incepta Vaccine Limited, Дакка), содержащая инактивированные клетки $1,5 \times 10^{11}$ КОЕ *V. cholerae* O1 и 5×10^{10} КОЕ *V. cholerae* O139. Каждая доза вакцины Cholvaх в ИФА содержит 1500 единиц ЛПС *V. cholerae* O1 и 600 единиц O139 ЛПС (соотношение 5:2), выпускается в форме суспензии [Lopez A.L. *et al.*, 2014; Shaikh H. *et al.*, 2020; Chowdhury F. *et al.*, 2022]. Вакцинация проводится двукратно взрослым и детям от 1 года с интервалом 14 суток.

Вакцина Vaxchora (США) содержит живые клетки *V. cholerae* CVD 103-HgR – от 4×10^8 до 2×10^9 КОЕ [Saluja T. *et al.*, 2020]. Вакцина упакована в индивидуальную коробку на одну дозу, содержащую первый пакет (№ 1) с лиофилизированной вакциной и второй пакет (№ 2) с буферным порошком. Вакцинация проводится однократно взрослым от 18 до 64 лет.

В данных вакцинах для определения специфической активности компонентов используются методы *in vitro*. Концентрацию ЛПС определяют в ИФА. Остаточную токсичность ХТ в готовой лекарственной форме определяют с помощью GM₁-ганглиозидов в ИФА (должна составлять менее 50 нг/10¹¹). Остаточный формальдегид определяют в цветной реакции (NMT 10 mM). В Dukoral дополнительно контролируют количество В-субъединицы в ИФА [European Pharmacopoeia, 2013, 2019]. 11-е издание Международной фармакопеи имеет особое значение для стран с низким и средним уровнем дохода, у которых нет достаточных ресурсов для разработки национальных фармакопей [The International Pharmacopoeia, 2020]. Тест на безвредность – это контроль качества готовой лекарственной формы, который применяется для обнаружения токсических загрязнений. Принцип действия теста заключается во введении продукта морским свинкам, белым мышам. Серия считается безвредной, если ни одно животное не погибнет или не проявит признаки болезни. Но в последние годы тест на безвредность ставят под сомнение, так как использование животных недостаточно специфично и воспроизводимо [Lei D. *et al.*, 2020].

Единственным профилактическим препаратом против холеры, зарегистрированным на территории РФ, является выпускаемая ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой» и рекомендована для взрослых и детей с двух лет. Серийный выпуск иммунобиологического лекарственного препарата осуществляется с 1995 г. В России вакцинация против холеры включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям [Приказ Минздрава РФ № 1122н]. Холерная химическая вакцина с 2020 г. входит в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. В отличие от перечисленных выше препаратов, не содержит в своем составе бактериальные клетки *V. cholerae*, является химической вакциной. Отмечается, что российская холерная химическая вакцина не уступает по эффективности зарубежным вакцинам [Щуковская Т.Н. и др., 2009; Горяев А.А. и др., 2018; Беспалова И.А. и др., 2018] и является уникальным по составу действующих веществ, форме выпуска и кратности иммунизации (вакцинацию проводят однократно) современным профилактическим препаратом против холеры. Вакцина состоит из холерогена-анатоксина и О-антигена, полученных из инактивированных формалином бульонных культур *V. cholerae* О1 классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* серовара Огава [Джапаридзе М.Н. и др., 1981; Анисимов П.И. и др., 1997].

Продуцентами специфических компонентов холерной вакцины являются природные токсигенные штаммы *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41. Для обеспечения производства вакцины необходимо сохранение стабильности основных культурально-морфологических, физиологических и продуктивных свойств в ряде поколений производственных штаммов *V. cholerae* – продуцентов основных антигенов [Леви Д.Т. и др., 2016].

Основные противохолерные оральные вакцины, выпускаемые в настоящее время, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Современные оральные холерные вакцины

Наименование	Dukoral	Shanchol	Euvichol Euvichol-Plus	OraVacs	mORC-VAX	Vaxchora	Cholvax	Вакцина холерная бивалентная
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Тип вакцины	Инактивированная комбинированная	Инактивированная цельноклеточная	Инактивированная цельноклеточная	Инактивированная цельноклеточная	Инактивированная цельноклеточная	Живая	Инактивированная цельноклеточная	Химическая
Активные компоненты	Инактивированные нагреванием: <i>V. cholerae</i> O1 classical Inaba ($2,5 \times 10^9$), classical Ogawa ($2,5 \times 10^9$); инактивированные формалином: classical Ogawa ($2,5 \times 10^9$), El Tor Inaba ($2,5 \times 10^9$). Рекомбинантная В-субъединица 1 мг	Инактивированные нагреванием: <i>V. cholerae</i> O1 classical Ogawa, classical Inaba; инактивированные формалином: classical Ogawa, El Tor Inaba, <i>V. cholerae</i> O139	Инактивированные нагреванием: <i>V. cholerae</i> O1 classical Inaba, classical Ogawa, инактивированные формалином classical Ogawa, El Tor Inaba, <i>V. cholerae</i> O139	Инактивированные клетки <i>V. cholerae</i> O1 – $5,0 \times 10^{10}$ КОЕ и рекомбинантную В-субъединицу – 1 мг	Инактивированные нагреванием: <i>V. cholerae</i> O1 classical Ogawa, classical Inaba; инактивированные формалином: classical Ogawa, El Tor Inaba, <i>V. cholerae</i> O139	Рекомбинантный штамм classical Inaba CVD 103-HgR <i>V. cholerae</i> O1 с делецией <i>ctxA</i> и вставкой маркера устойчивости к Hg ++ в <i>hlyA</i> (инактивирующий гемолизин А) (~ 108 КОЕ)	Инактивированные клетки <i>V. cholerae</i> O1 ($1,5 \times 10^{11}$); <i>V. cholerae</i> O139 (5×10^{10})	Смесь холерогена-анатоксина и О-антигена, полученных из инактивированных формалином бульонных культур штаммов <i>V. cholerae</i> O1 569В классического биовара серовара Инаба и <i>V. cholerae</i> М-41 классического биовара серовара Огава, путем выделения, очистки и концентрирования сернокислым аммонием

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Страна производитель/ год начала производства	Швеция/ 1991	Индия/ 2009	Южная Корея/ 2015	Китай -	Вьетнам/ 1997	США/ 2016	Народная Республика Бангладеш -	Российская Федерация/ 1995
Форма выпуска	Суспензия в комплекте с гранулами шипучими для приготовления раствора для приема внутрь	Суспензия	Суспензия	Капсулы	Суспензия	Суспензия в комплекте с буфером для приготовления раствора для приема внутрь	Суспензия	Таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой
Схема применения	2-х кратная вакцинация для детей от 6 лет и взрослых с интервалом 1-6 недель; 3-х кратная для детей от 2 до 6 лет с интервалом 1-6 недель. Ревакцинация: взрослым и детям в возрасте от 6 лет: через 2 года, детям от 2 до 6 лет: через 3мес	2-х кратная вакцинация взрослым и детям от 1 года с интервалом 14 суток	2-х кратная вакцинация взрослым и детям от 1 года с интервалом 14 суток	3-х кратная вакцинация взрослым и детям от 11 лет: по 3 капсулы с интервалом 0-7-28 суток	2-х кратная вакцинация взрослым и детям от 1 года с интервалом 14 суток	1-кратная вакцинация взрослым от 18 до 64 лет	2-х кратная вакцинация взрослым и детям от 1 года с интервалом 14 суток	1-кратная вакцинация для взрослых и детей с 2 лет

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Статус	преквалифицированная ВОЗ	преквалифицированная ВОЗ	преквалифицированная ВОЗ	Национальная	Национальная	Национальная	Национальная	Национальная
Методы контроля специфических антигенов в готовой лекарственной форме	ИФА В-субъединица холерного токсина О-Антиген	ИФА О-Антиген	ИФА О-Антиген	ИФА В-субъединица холерного токсина О-Антиген	ИФА О-Антиген	ИФА О-Антиген	ИФА О-Антиген	РНГА О-Антиген Анатоксиносвязывание (ЕС) Холероген-анатоксин
Методы контроля безопасности вакцины	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>

Примечание: «-» – нет данных

Производство вакцин, как и других лекарственных препаратов, осуществляется в соответствии с Правилами надлежащей производственной практики (GMP) [Приказ № 916, 2013; Решение № 77, 2016] и Государственной Фармакопее (ГФ) РФ [ГФ РФ XIV, 2018]. Данные нормативные документы включают комплекс требований к производству и контролю качества иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП). Качество вакцин предусматривает обязательный поэтапный контроль на безопасность на разных стадиях технологического процесса и включает в себя контроль исходного сырья, полуфабриката и готовой лекарственной формы [Медуницын Н.В., 2000].

ИЛП имеют сложный состав, их не всегда можно охарактеризовать физическими или химическими методами, необходимо тестировать их биологическую активность. При производстве зарубежных вакцин, например, Dukoral, применяют методы *in vitro* для контроля специфической активности компонентов. В частности, для контроля количественного содержания клеток, активности ЛПС и В-ХТ применяется ИФА [http://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/dukoral-epar-summary-public_en.pdf (дата обращения 23.11.2021)].

Производимые в Российской Федерации виды ИЛП, в первую очередь вакцины, по своему качеству в основном соответствуют требованиям ВОЗ и только по отдельным требованиям и методам испытаний незначительно отличаются от требований зарубежных фармакопей. Одним из факторов гармонизации российских требований с требованиями международных фармакопей является отказ от практики использования лабораторных животных при определении таких показателей качества, как «специфическая активность», «токсичность», «безвредность» и переход на методы *in vitro*.

Замена методов не может быть чисто механической, этому должны предшествовать серьезные сравнительные исследования, подтверждающие корреляцию результатов обоих методов [Мовсисянц А.А., 2016]. Методы *in vivo* имеют ряд недостатков, такие как индивидуальная чувствительность жи-

вотных, сложность в постановке тестов, материальные затраты (длительность проведения, уход за животными), биоэтическая сторона вопроса. ВОЗ рекомендует отойти от биологических методов, связанных с животными, и заменить их на методы *in vitro*. Сегодня вопросы этического, разумного и экономного использования животных для исследований в области медицины, биологии и ветеринарии привлекают все большее внимание специалистов и общественности. В 1959 У. Рассел и Р. Берч издали книгу «The principle of humane experimental technique», в которой была обоснована концепция гуманного использования животных в экспериментах, получившая название «Концепция трех R» (Replacement, Reduction, Refinement) [Russell W.M.S., Burch R.L., 1959]. Данная концепция признана общепринятым стандартом, благодаря которому разрабатываются альтернативные методы исследования, что способствует уменьшению количества лабораторных животных [Mattia F. D. *et al.*, 2011].

Все вышеизложенное подчеркивает приоритетность исследований по разработке методических подходов для контроля активных компонентов на этапах производства холерной химической вакцины с использованием методов *in vitro*.

1.2 Основные протективные антигены холерного вибриона и способы оценки их специфической активности

Заболевание холерой обусловлено комплексом факторов патогенности холерного вибриона, играющих определенную роль в инфекционном процессе. В формировании иммунитета против холеры участвует ряд основных протективных антигенов холерного вибриона. К ним относятся: холерный токсин, О-антиген, токсин-корректируемые пили адгезии (ТСП), белки внешней мембраны (ОМР), ферменты [Yoon S.H. *et al.*, 2019].

Холерный токсин – экзотоксин, вызывающий признаки и симптомы холеры. Он уникален во многих отношениях, начиная от структуры и заканчи-

вая функциями. ХТ – термолабильный и многофункциональный белок, способный влиять на иммунную систему разными способами. Он не только обладает адьювантными свойствами, но также действует как противовоспалительный агент, модулируя пути передачи определенных сигналов [Bharati K. *et al.*, 2011; Baldauf K.J. *et al.*, 2015; Kenworthy A.K. *et al.*, 2021]. Продуцируемый *V. cholerae* ХТ является фактором, вызывающим диарею с тяжелой дегидратацией и играет ведущую роль в патогенезе холерной инфекции.

ХТ с молекулярной массой 84 кДа состоит из пяти идентичных В-субъединиц (11,6 кДа) и одной А-субъединицы (27,2 кДа), которые образуют димеры, тримеры, тетрамеры и пентамеры, регистрируемые в электрофоретическом анализе [Zhang R. *et al.*, 1995; Fan E. *et al.*, 2000; Fullner K.J. *et al.*, 2001; Beddoe T. *et al.*, 2010; Chiricozzi E. *et al.*, 2018]. В-ХТ обеспечивает связывание с рецепторами эпителиальных клеток тонкой кишки и представляет собой гомопентамерный нетоксичный белок, связывающийся с ганглиозидом GM₁ и вызывающий образование антител к В-ХТ, нейтрализующих действие ХТ, тем самым стимулирует локальный иммунитет. В-ХТ нетоксична и поэтому является одним из основных иммуногенных компонентов, формирует антитоксический иммунитет. Обнаружение В-ХТ актуально и для диагностики холеры [Заднова С.П. и др., 2007; Ключева С.Н. и др., 2012; Wernick N.L.B. *et al.*, 2010; Jobling M.G. *et al.*, 2012; Basu I. *et al.*, 2014; Heggelund J.E. *et al.*, 2015; Clemens J.D. *et al.*, 2017]. В настоящее время в качестве компонента лицензированной на международном уровне пероральной вакцины Dukoral против холеры используется рекомбинантная В-ХТ [Royal J.M. *et al.*, 2017].

Рецептором для ХТ на поверхности энтероцитов является ганглиозид GM₁. В основе биологического действия ХТ лежит его способность вызывать устойчивую длительную активацию аденилатциклазной системы в клетках кишечника, что приводит к накоплению циклического аденозинмонофосфата, являющегося внутриклеточным стимулятором кишечной секреции [Lencer W.I. *et al.*, 2003; Chinnapen D.J-F. *et al.*, 2007; Sanchez J. *et al.*, 2008; Saslowsky

D.E. *et al.*, 2013; Baldauf K.J. *et al.*, 2015; Cervin J. *et al.*, 2018; Banerjee T. *et al.*, 2021]. Таким образом, предотвращение проникновения токсина в клетки эпителия кишечника путем блокирования его присоединения к ганглиозиду GM₁ считается хорошей мишенью для разработки профилактических препаратов [Zuilhof H., 2016; Kumar V. *et al.*, 2018].

A-ХТ и В-ХТ отличаются между собой функциональными и иммунологическими свойствами. А-ХТ, обладая NAD-гликогидролазной и АДФ-рибозилтрансферазной активностью, обеспечивает токсическую активность всей молекулы. А-ХТ нуждается в В-ХТ, как в транспортном средстве внутрь клетки. Структурные гены *ctxA* и *ctxB*, кодирующие субъединицы А и В, расположенные на хромосоме, образуют оперон, в котором *ctxA* предшествует *ctxB*. Гены *ctxAB* кодируют ХТ, ответственный за основные клинические симптомы заболевания [Broeck D.V. *et al.*, 2007; Sanchez J. *et al.*, 2008; Safa A. *et al.*, 2020; Haigh J.L. *et al.*, 2020].

За индукцию антитоксического иммунитета несет ответственность преимущественно В-ХТ. Известно, что токсины разных биоваров иммунологически неидентичны, токсин *V. cholerae* классического биовара относят к I типу, а холерный токсин *V. cholerae* биовара Эль Тор – ко II типу [Sanchez J. *et al.*, 2011].

Для стабильной продукции специфических антигенов холерными вибрионами требуются питательные среды, соответствующие определенным требованиям (рН, ряд легкоусваиваемых веществ и т.д.). В производстве холерной химической вакцины используют ограниченное количество сред. Культивирование холерных вибрионов осуществляется как на плотных, так и на жидких питательных средах. Холерный вибрион является факультативным анаэробом, хорошо растет на простых питательных средах при рН 7,6-8,6, температуре от 10 до 40 °С. Для культивирования холерного вибриона применяются мясо-пептонный, Хоттингера, LB бульоны [Дятлов И.А. и др., 2012]. Для стимуляции продукции холерного токсина штаммами *V. cholerae* биовара Эль Тор применяется среда АКІ. Данная среда применялась в лабо-

раторной диагностике для определения наличия у штаммов *V. cholerae* классического и Эль Тор биоваров продукции холерного токсина и дифференциации их по эпидемической значимости, выявления токсигенных штаммов холерных вибрионов в клиническом материале от человека [Михеева Е.А. и др., 2017]. Среда АКІ является специально подобранной средой для получения ХТ II типа, продуцируемого природными штаммами *V. cholerae* биовара Эль Тор [Iwanaga M. *et al.*, 1986]. Рядом авторов был получен патент на питательную среду, содержащую ферментативный гидролизат фибрина, для глубокого культивирования холерного вибриона с целью производства медицинских иммунобиологических препаратов [Антонычева М.В. и др., 2011]. В работе Никифорова А.К. с соавторами [Никифоров А.К. и др., 2015] было проведено экспериментальное культивирование холерных вибрионов штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В для сравнения эффективности по выходу антигенов на жидких питательных средах на основе панкреатического перевара фибрина и автолизата пекарских дрожжей и средах, традиционно используемых для производственного культивирования штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В.

Специфические антигены холерной химической вакцины получают из бульонных культур штаммов-продуцентов, выращенных методом глубокого культивирования в биореакторах. Поэтому оптимизация условий роста микробной популяции с целью увеличения синтеза О-антигена и холерного токсина, из которого посредством формоловой детоксикации получают холероген-анатоксин, остается актуальным направлением исследований.

Процесс формоловой детоксикации является важной стадией в производстве холерной химической вакцины. Известно, что физические и химические агенты, инактивирующие клетки вибрионов, существенно влияют на структуру ЛПС, а формалин является наименее повреждающим агентом. Поэтому разработчиками вакцины – М.Н.Джапаридзе с соавторами был выбран метод именно формоловой детоксикации и определены основные параметры процесса детоксикации [Джапаридзе М.Н. и др., 1993].

Холероген-анатоксин (ХА) – препарат, полученный путем формоловой детоксикации ХТ, полностью лишенный токсических свойств, но сохранивший антигенные и иммуногенные свойства. На первых этапах детоксикация протекает очень быстро (как правило, на 1-4-е сутки инкубирования с формалином наблюдается падение токсичности на 80-90 %), а достижение полной безвредности происходит только через 2-4 недели и более. Для получения безвредных и стабильных анатоксинов после обезвреживания должно пройти некоторое время для «созревания» анатоксинов [Джапаридзе М.Н. и др., 1976; Комиссаров А.В. и др., 2014].

К методам контроля *in vivo* относятся определение вирулентности на модели кроликов-сосунков; определение «остаточной» токсигенности (выявление фактора сосудистой проницаемости и дерматонекротического фактора) в кожной пробе; определение «остаточной» токсигенности в лигированных петлях тонкого кишечника взрослых кроликов; определение «остаточной» токсигенности, реактогенности и приживаемости штамма при внутрижелудочном заражении взрослых кроликов. На промежуточных стадиях производства вакцины используют общепринятые методы проверки токсичности на лабораторных животных [МУ 3.3.1.2075-06, 2006].

Качество ХА определяется специфической активностью ХТ, которая тестируется в соответствии с ПР методом кожной пробы по Крейгу, иммунохимическими методами. Количество ХА в готовой лекарственной форме вакцины определяется по специфической активности антигена в реакции анатоксинотсвязывания. В данных реакциях, а также для получения антихолерогенной сыворотки используется ХТ. Завершающая стадия изготовления вакцины – это контроль качества готового препарата по нормируемым физико-химическим, микробиологическим, иммунохимическим свойствам, специфической активности.

Генетические методы на основе ПЦР позволяют выявить наличие в бактериях гена токсигенности, а так же информацию о способности микроорганизма к экспрессии биологически активного токсина.

Для обнаружения ХТ также применяется обратная пассивная латексная агглютинация, петлевая изотермическая амплификация (LAMP) [Li Y. *et al.*, 2017], протеомный метод, масс-спектрометрические методы и их комбинации [Matias W.R. *et al.*, 2017].

Иммунохимические методы обнаружения и количественного анализа ХТ остаются наиболее используемыми и достоверными. На их основе разработаны коммерческие тест-системы, некоторые из них имеют высокую чувствительность [Петрова Е.Э. и др., 2009]. К таким тестам относятся варианты иммуноферментного анализа, тест с иммунохроматографическими полосками, который является одним из наиболее часто используемых анализов [Yamasaki E. *et al.*, 2013, 2017; Arimitsu H. *et al.*, 2017].

Для определения активности ХТ широко апробированным является метод GM₁ ELISA. Он является наиболее чувствительным, так как связан с использованием ганглиозидов GM₁, обладающих сродством к иммуногенной В-ХТ [Маркина О.В. и др., 2011; Михеева Е.А. и др., 2014; Edwards K.A. *et al.*, 2007; Евдокимова В.В. и др., 2016]. Данный метод перспективен для определения остаточной токсичности ХА. ИФА на основе моноклональных антител, разработанный сотрудниками института «Микроб», позволяет проводить детекцию токсигенных штаммов [Михеева Е.А. и др., 2014]. В производстве зарубежных вакцин, в том числе против холеры, применяются методы ИФА для контроля компонентов (Dukoral) [http://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/dukoral-epar-summary-public_en.pdf (дата обращения 23.11.2021)].

Современные технологии позволяют разрабатывать новые альтернативные модели для токсикологических исследований. Так, система клеточного анализа в режиме реального времени RTCA iCELLigence основана на микроэлектронных биосенсорах, которые позволяют динамически и в реальном времени анализировать клеточный ответ без использования дополнительных маркеров или меток [Jin D. *et al.*, 2013]. Еще одним направлением является разработка вариантов микробиореакторов. Микробиореакторы представляют

собой микрофлюидные системы, содержащие модули для совместного культивирования нескольких органоспецифических клеточных линий и моделирующие взаимодействия между ними в условиях близкого к физиологическому току жидкости. Микробиореакторы, моделирующие физиологические взаимодействия между органами, позволяют проводить более эффективный скрининг лекарственных веществ и их комбинаций [Сенявина Н.В. и др., 2013; Tsui J.H. *et al.*, 2013].

В литературных источниках приводятся результаты исследований, свидетельствующие о возможности использования перевиваемых клеточных культур для детекции ХТ. Чаще всего в работе с ХТ используют клеточные линии Vero, СНО-К1, Y1. Данные методы высокочувствительны и воспроизводимы, так как в работе используются стандартные среды и референтные клеточные линии. Установлено, что по чувствительности эти тесты сопоставимы с разрешающей способностью биопробы. Наиболее чувствительной линией в отношении ХТ является культура СНО-К1, позволяющая выявлять до 20-30 пг/мл токсина, в то же время наиболее приближенной моделью к условиям *in vivo* является культура эпителиальных клеток тонкого кишечника человека CaCo2, образующая монослой, подобные нормальному эпителию кишечника [Сальникова О.И., 1994; Маркина О.В. и др., 2007; Фрешни Р.Я., 2010; Дмитруха Н.Н., 2013].

О-антиген (эндотоксин) является основным фактором иммуногенности, обеспечивающим формирование антибактериального иммунитета к холере, входящий в состав ЛПС [Whitfield C. *et al.*, 2020]. О-Аг обладает свойствами эндотоксина и представляет собой липополисахаридобелковый комплекс, входящий в состав бактериальной оболочки, а именно во внешнюю мембрану клетки. Он определяет серологическую специфичность вибрионов и лежит в основе всех предложенных классификаций [Li X. *et al.*, 2019].

ЛПС *V. cholerae* состоит из липида А, ответственного за токсические свойства ЛПС, и полисахарида, который подразделяется на основную или коровую часть и О-специфические боковые цепи, представляющие собой О1-

антиген, который определяет серологические свойства клетки. О-Аг представляет собой термостабильный гомополимер, содержащий до 60 мономерных единиц, которые локализованы на поверхности бактериальной клетки [Seed K.D. *et al.*, 2012; Ghazi F.M.P. *et al.*, 2016; Baranova D.E. *et al.*, 2020; Luna E. *et al.*, 2021].

В ряде работ [Aktar A. *et al.*, 2018; Baranova D.E. *et al.*, 2018; Mukherjee M.M. *et al.*, 2019; Charles R.C. *et al.*, 2020] показано, что антитела к О-Аг предотвращают адгезию и последующую колонизацию холерными вибрионами тонкого кишечника. Антитела, образующиеся против эндотоксина, обладают выраженным вибриоцидным действием и являются важным компонентом постинфекционного и поствакцинального иммунитета. Решающая роль О-Аг в иммунитете доказана результатами полевых испытаний вакцин, в состав которых входил очищенный ЛПС, и исследованиями на модели лабораторных животных. Высокая эффективность антибактериального иммунитета при холере обусловлена участием О-Аг в адгезии клеток *V.cholerae* к энтероцитам слизистой оболочки тонкого кишечника. Выраженное иммуногенное действие О-Аг определяет необходимость включения его в вакцинные препараты в качестве обязательного компонента.

На данный момент оценку активности О-Аг на этапе получения и в готовой лекарственной форме холерной химической вакцины проводят методами РДП и РНГА с использованием набора реагентов для определения содержания О-Аг в РНГА [ГФ РФ XIV, 2018]. В зарубежных вакцинах против холеры контроль ЛПС осуществляется с помощью ИФА [ВНО, 2004]. В работе Сыровой Н.А. [Сырова Н.А., 2005] представлено определение активности О-Аг в процессе масштабного культивирования производственных штаммов холерного вибриона методом ДИА с применением поликлональных антител. Была изучена возможность применения ДИА для контроля синтеза О-Аг штаммами *V. cholerae* [Федорова В.А. и др., 2000].

В своем составе холерная химическая вакцина содержит и другие биологически активные вещества, однако их количественное содержание в вакцине не нормируется.

Токсин-корректируемые пили адгезии (TCP). V. cholerae колонизирует тонкий кишечник с помощью TCP и взаимодействует с рецепторами кишечного эпителия. TCP являются ключевыми факторами адгезии холерных вибрионов [Weber G.G. *et al.*, 2011]. Первой стадией колонизации холерного вибриона в тонком кишечнике является адгезия. Все штаммы *V. cholerae*, независимо от биовара, продуцируют пили адгезии. После адгезии вибрионы утрачивают подвижность и интенсивно размножаются, колонизируя микроворсинки тонкого кишечника [Shi M. *et al.*, 2020]. TCP являются иммуногенами, антифибриллярные антитела препятствуют прикреплению и колонизации патогенных вибрионов [Ehara M. *et al.*, 1993].

Важную роль в развитии инфекционного процесса при холере играют различные *внеклеточные ферменты холерного вибриона*, хотя они и не являются ведущими факторами патогенности. *V. cholerae* экскретирует многочисленные ферменты, которые облегчают его адаптацию как в кишечнике, так и к водной среде. Ферменты холерного вибриона представляют собой термолабильные белки. Наиболее значимыми в дезорганизации биологических мембран и межклеточного матрикса в динамике холерной инфекции являются протеаза, коллагеназа, эластаза, фибринолизин, муциназа, амилаза. Антитела против ряда ферментов обладают вибриоцидным действием, и подавляют размножение холерного вибриона [Гальцева Г.В., 1995; Телесманич Н.Р. и др., 2006; Титова С.В. и др., 2016; Ghosh A. *et al.*, 2006, 2016; Seper A. *et al.*, 2011, 2013; Shinoda S. *et al.*, 2011; Sikora A.E. *et al.*, 2011; Miyoshi Sh-I. *et al.*, 2013; Eneva R.T. *et al.*, 2015; Mukherjee A. *et al.*, 2016; Howell M. *et al.*, 2019; Pressler K. *et al.*, 2019; Fan Y. *et al.*, 2019]. Также в ХА были обнаружены восемь гидролитических ферментов (протеаза, фосфолипаза А₂, фосфолипазы С, лизофосфолипазы, твиназы, ДНК-аза, РНК-аза, амилаза) [Кузьмиченко И.А. и др., 2010; Громова О.В. и др., 2012].

Белки наружной мембраны холерного вибриона (ОМР) являются факторами иммуногенности, обеспечивающими формирование антибактериального иммунитета при холере. Вместе с ТСР в колонизации энтероцитов кишечника принимают участие белки внешней мембраны холерного вибриона [Li H. *et al.*, 2018]. ОМР являются важными поверхностными компонентами холерного вибриона, которые участвуют в различных клеточных процессах, таких как поглощение питательных веществ, передача сигналов окружающей среды и устойчивость к противомикробным препаратам [Мишанькин Б.Н. и др., 2014; Иванова И.А. и др., 2017].

Холерная химическая вакцина производства ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора представляет собой смесь холерогена-анатоксина и О-антигенов, полученных из инактивированных формалином бульонных культур *V. cholerae* О1 классического биовара штаммов 569В серовара Инаба и М-41 серовара Огава, путем выделения, очистки и концентрирования серноокислым аммонием. Конструирование данной вакцины проводили, исходя из положения о том, что в полноценной вакцине все известные факторы патогенности возбудителя должны быть представлены максимально полно без дезинтеграции их молекулярной структуры и в оптимальном для создания иммунитета количестве. Холерная химическая вакцина содержит холероген-анатоксин, О-антигены, факторы адгезии и экзоферменты (нейраминидаза, протеаза, фосфолипаза, гиалуронидаза, амилаза, РНК-аза, ДНК-аза, АТФ-аза и др.).

В процессе производства холерной вакцины осуществляется контроль основных антигенных компонентов: холерогена-анатоксина и О-антигена. Методы контроля компонентов вакцины позволяют оценивать их специфическую активность на всех стадиях технологического процесса с момента культивирования штаммов-продуцентов (таблица 2).

Таблица 2 – Методы контроля специфической активности антигенных компонентов холерной химической вакцины на этапах производства

Антигенный компонент	Контролируемое свойство	Методы контроля	
		Используемые в настоящее время	Перспективные
Холерный токсин	Специфическая активность	Метод кожной пробы по Крейгу на кроликах, РДП	ИФА с использованием GM ₁ -ганглиозидов и ДИА ЗНЧ. Метод <i>in vitro</i> с использованием перевиваемых клеточных культур и РПИГ
	Токсигенность	Тест на кроликах-сосунках	Метод <i>in vitro</i> с использованием перевиваемых клеточных культур. ПЦР для детекции гена <i>ctxA</i>
Холеро-ген-анатоксин	Специфическая активность	Реакции анатоксиносвязывания на кроликах	ИФА с использованием GM ₁ -ганглиозидов и ДИА ЗНЧ
	Остаточная токсичность	Тест на кроликах-сосунках	Метод <i>in vitro</i> с использованием перевиваемых клеточных культур и ИФА с использованием GM ₁ -ганглиозидов
О-антиген	Специфическая активность	Реакция непрямой гемагглютинации	ДИА ЗНЧ

1.3 Требования к стабильности бактериальных штаммов, используемых в производстве иммунобиологических препаратов

Одним из основных требований к штаммам-продуцентам, используемым в производстве ИЛП, является их стабильность, которая заключается в «сохранении основных культурально-морфологических, физиологических и продуктивных свойств в ряде генераций» [ОФС.1.7.1.0010.18]. Международ-

ный совет по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для медицинского применения (ICH), ГФ РФ служит основным документом, содержащим совокупность методов анализа (физических, химических, биологических и т. д.), позволяющих установить качество лекарственного средства в соответствии с областью его применения и рекомендует давать детальную характеристику вакцинным штаммам и составу вакцин [Береговых В.В., 2017; ГФ РФ XIV, 2018].

Необходимость изучения стабильности свойств вакцинных штаммов согласуется с рекомендациями ВОЗ по производству и контролю качества ИЛП для обеспечения их безопасности и эффективности [WHO, 2005].

Безопасность лекарственных средств во многом зависит от качества исходного сырья, что обуславливает значимость контрольных исследований в отношении посевного материала [ОФС.1.7.1.0010.18, 2018; ОФС.1.7.1.0018.18, 2018; ОФС.1.7.1.0011.18, 2018]. Для предотвращения нежелательного изменения свойств, которое может произойти вследствие многократных пересевов или большого числа генераций, производство ИЛП, получаемых из культур микроорганизмов, должно быть основано на системе главной и рабочей посевных культур. Посевные культуры необходимо создавать, хранить и использовать таким образом, чтобы риск их контаминации или изменения был минимальным. Контроль используемых штаммов включает в себя физико-химические и биологические методы, которые характеризуются более высокой степенью вариабельности. В производстве ИЛП и анатоксинов [ОФС.1.7.1.0004.15, 2018] используются рабочие посевные серии микроорганизмов, которые должны обладать теми же характеристиками, что и штамм, из которого получена исходная посевная серия. Методы культивирования должны обеспечивать сохранение иммуногенных свойств вакцинных штаммов, безопасность препарата и предотвращать контаминацию посторонними вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами.

При производстве пробиотиков [ОФС.1.7.1.0008.15, 2018; ОФС.1.7.2.0012.15, 2018] стабильность генетических и фенотипических ха-

рактистик штамма-продуцента должна быть показана на материале, полученном до и после количества удвоений или количества пассажей клеток, ожидаемых при полномасштабном производстве. Данные должны включать сведения о проценте клеток, удерживающих экспрессирующую конструкцию, копияность гена, уровень экспрессии белка, характеристику рекомбинантного белка установленными методами и/или нуклеотидную последовательность гена.

Использование достижений науки для определения рациональной стратегии конструирования иммунобиологических препаратов позволило в последние годы достигнуть определенного прогресса в создании не только субъединичных вакцин на основе рекомбинантных антигенов, но также живых и векторных препаратов на платформе безопасных штаммов бактерий [Микшис Н.И., Кутырев В.В., 2019]. Разработан и лицензирован препарат вакцины чумной молекулярной микроинкапсулированной. Данная вакцина состоит из рекомбинантных капсульного антигена и V-антигена чумного микроба, заключенных в микрокапсулы [Дятлов И.А. и др., 2018]. Микшис Н.И с соавторами [Микшис Н.И. и др., 2018] разработан прототип сибирезвенной вакцины, содержащий рекомбинантный протективный антиген и белок S-слоя EA1. В преквалифицированной вакцине Dukoral используется рекомбинантная В-субъединица [http://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/dukoral-epar-summary-public_en.pdf (дата обращения 23.11.2021)]. Производство лекарственных средств, получаемых с использованием методов рекомбинантной ДНК, должно быть основано на системе серий посевного материала, а нуклеотидная последовательность гена должна быть подтверждена не только на стадии посевного материала, но и на конечной стадии роста клеточной популяции [ОФС.1.7.1.0007.15, 2018; ОФС.1.7.1.0013.18, 2018].

В общих фармакопейных статьях в составе ГФ РФ XIV предъявляются следующие требования к ИЛП: эффективность, качество и безопасность. Данный подход принят не только в РФ, но и во всем мире. В доступной лите-

ратуре отсутствуют сведения по стабильности штаммов-продуцентов активных компонентов, входящих в состав ИЛП на этапах производства.

Согласно МУ 3.3.1.2075-06 «Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона» [МУ 3.3.1.2075-06, 2006], стабильность штаммов холерного вибриона для изготовления живой вакцины оценивается по следующим показателям по комплексу тестов *in vivo* и *in vitro*:

- стабильная утрата способности вызывать заболевание, но сохранение способности «приживаться» до 3 суток в кишечнике человека и животных (кроликов);

- утрата способности синтезировать токсин;

- отсутствие или повреждение гена, кодирующего синтез А-ХТ, должно быть подтверждено с помощью тест-системы для выявления ДНК *V. cholerae ctxA* методом ПЦР (отрицательный результат в ПЦР);

- стабильность культурально-морфологических, биохимических, серологических, генетических и иммуногенных свойств в процессе культивирования в производственных условиях.

Штаммы *V. cholerae* O1, используемые в производстве химической холерной вакцины, должны иметь типичные культурально-морфологические, биохимические и антигенные свойства; обладать холерогенными, токсигенными и иммуногенными свойствами [ФС.3.3.1.0020.15, 2018]. Согласно промышленному регламенту, для оценки свойств производственных штаммов используют комплекс тестов *in vivo* и *in vitro*. Критерии, регламентирующие контроль стабильности штаммов на этапах производства вакцины, в действующем ПР отсутствуют.

В настоящее время для совершенствования подходов по верификации вакцинных штаммов в процессе длительного хранения для определения его генетической стабильности представляется перспективным использование полногеномного секвенирования. Полногеномное секвенирование дает информацию о последовательности и структуре всего генома исследуемых штаммов и может быть использовано для подтверждения подлинности и для

оценки стабильности. В работе Саяпиной Л.В. [Саяпина Л.В. и др., 2022] рассмотрен вопрос хранения и поддержания эталонной линии вакцинного штамма *F. tularensis* 15НИИЭГ, предназначенного для производства вакцины туляремийной живой вакцины. Авторы отмечают, что в настоящее время в нормативных документах отсутствуют требования к генетической стабильности штамма и считают, что использование полногеномного секвенирования позволит в полной мере оценить изменения в геноме вакцинного штамма и определить его аутентичность в процессе хранения в лиофилизированном состоянии, при анимализации и подготовке последующей серии вакцинного штамма.

Острашевской Е.В. с соавторами [Острашевская Е.В. и др., 2018] было проведено полногеномное секвенирование и последующий сравнительный анализ образцов суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) от рабочего банка до конечного пассажа производственного культивирования, а также производственных серий вакцины БЦЖ. Авторы отмечают, что стабильность генома суб-штамма опосредованно подтверждает стабильность производственных условий культивирования и качество производственного процесса.

Следует отметить перспективность применения в оценке стабильности производственных штаммов таких методов, как атомно-силовая и трансмиссионная микроскопия, полногеномное секвенирование. Факторы окружающей среды могут привести к изменению поверхностных структур клетки. АСМ и ТЭМ позволяют оценить морфометрические параметры бактерий [Уткин Д.В., 2012, 2019; Ерохин П.С. и др., 2016].

Обзор существующих в настоящее время требований к стабильности штаммов-продуцентов различных вакцин показал, что эти критерии относятся, в основном, к рекомбинантным вакцинам и пробиотикам. Нормативная документация с изложением четких требований к оценке стабильности штаммов-продуцентов химических вакцин отсутствует.

Следует отметить, что актуальным вопросом остается совершенствование способов контроля компонентов холерной химической 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. Совершенствованию методов контроля на этапах производства ИЛП может способствовать применение современных методов исследования, которые характеризуются высоким уровнем чувствительности, специфичностью, воспроизводимостью.

Обзор литературных источников подтверждает актуальность работы по исследованию стабильности производственных штаммов *V. cholerae* и разработке методических подходов *in vitro* для контроля антигенных компонентов и готовой лекарственной формы холерной химической вакцины на этапах производства.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования с использованием патогенных биологических агентов II группы патогенности проводили в соответствии с действующими Санитарными правилами и нормами «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» [СанПиН 3.3686-21, 2021].

2.1 Материалы

2.1.1 Бактериальные штаммы

В работе использовали штаммы из государственной коллекции патогенных бактерий (ГКПБ) ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (таблица 3).

Таблица 3 – Бактериальные штаммы, использованные в работе

№	Штаммы <i>V. cholerae</i>	Биовар/ серовар	Источник выделения, место и год	Генетические характеристики
1	2	3	4	5
1	569В	classical/Inaba	От больного человека Индия, 1950	<i>ctxAB+tcpA+</i>
2	М-41	classical/Ogawa	Башкирия, г. Уфа, 1943	<i>ctxAB+tcpA+</i>
3	Р-18899	eltor/Inaba	От больного человека РФ, г. Мурманск, 2006	<i>ctxAB+</i>
4	М-1509	eltor/Ogawa	От больного человека РФ, г. Москва, 2012	<i>ctxAB+tcpA+</i>
5	М-1326	eltor/Ogawa	От больного человека РФ, Дагестан, с. Рубас, 1998	<i>ctxAB+</i>
6	М-1328	eltor/Ogawa	От больного человека РФ, Дагестан, с. Хорези, 1998	<i>ctxAB+</i>

1	2	3	4	5
7	М-1349	eltor/Ogawa	Контактный РФ, Татарстан, г. Казань, 2001	<i>ctxAB</i> +
8	М-1298	eltor/Ogawa	От больного человека РФ, г. Краснодар, 1993	<i>ctxAB</i> +
9	М-1344	eltor/Ogawa	От больного человека РФ, Татарстан, г. Казань, 2001	<i>ctxAB</i> +
10	М-1463	eltor/Ogawa	От больного человека РФ, г. Москва, 2010	<i>ctxAB</i> +
11	М-1345	eltor/Ogawa	От больного человека РФ, Татарстан, г. Казань, 2001	<i>ctxAB</i> +
12	КМ68 Tc ^R Km ^R	classical/Ogawa	Производный штамма <i>V.cholerae</i> Дакка 35 Российский проти- вочумный институт «Микроб»	<i>ctxAB</i> + pCO107-2 Km ^r Tc ^r
13	КМ76 Tc ^R Km ^R	classical/Inaba	Производный штамма <i>V.cholerae</i> 569В Российский проти- вочумный институт «Микроб»	<i>ctxAB</i> + pCO107-2 Km ^r Tc ^r
14	КМ234 Km ^R	eltor/Ogawa	Производный штамма <i>V.cholerae</i> МАК 757 Российский проти- вочумный институт «Микроб»	<i>ctxAB</i> + Tn5-mob Km ^r
15	КМ 197 Tc ^R Km ^R	classical/Ogawa	Производный <i>V.cholerae</i> Дакка35 Российский проти- вочумный институт «Микроб»	<i>ctxAB</i> + pCO107-2 Km ^r Tc ^r

Используемые в работе штаммы были типичными по культуральным, морфологическим, биохимическим, серологическим свойствам.

Рекомбинантные штаммы *V.cholerae* – продуценты ХТ сконструированы в отделе микробиологии под руководством профессора Смирновой Н.И. и любезно предоставлены для работы.

2.1.2 Питательные среды и реактивы

Для изучения культуральных свойств штаммов *V. cholerae*, подготовки посевного материала и определения специфической стерильности использовали бульон и агар Хоттингера pH 7,6, 1 % пептонную воду pH 7,6.

В работе использовали питательные среды на основе гидролизата казеина: жидкого основного раствора панкреатического гидролизата казеина лабораторного приготовления (ОРК) (свидетельство о государственной регистрации № 2018620718 от 18.05.2018 г.); сухого ферментативного (панкреатического) гидролизата казеина (ФГК). Все перечисленные основы имели pH ($8,0 \pm 0,1$) и содержали NaCl – 0,5 %, Na_2HPO_4 – 0,06 %, пептон до 1 %.

В работе использовали экспериментальную среду на основе ферментативного гидролизата фибрина (ФГФ) (ТУ 20.59.52-060-01898109-2021) pH 8,0 и содержанием 100 % аминного азота [Антонычева М.В., 2011]. Фибрин – отход производства антирабического иммуноглобулина, одним из путей рациональной утилизации которого является получение питательной основы ФГФ в результате гидролиза препаратом нативной поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Для культивирования природных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор использовали среду АКІ, которая является специально подобранной средой для получения ХТ II типа, продуцируемого природными штаммами *V. cholerae* биовара Эль Тор (1,5 % бакто-пептона, 0,4 % дрожжевого экстракта фирмы «Дифко», 0,5 % NaCl, 0,3 % NaHCO_2) [Михеева Е.А. и др., 2017; Iwanaga M. *et al.*, 1986].

Для постановки РПИГ использовали 1 % синказный агар (Na_2HPO_4 – 5 г/л, K_2HPO_4 – 5 г/л, NH_4Cl – 18 г/л, Na_2SO_4 – 0,089 г/л, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,042 г/л, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,004 г/л, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,005 г/л, казеиновые кислоты – 10 г/л, сахароза – 5 г/л, агар готовится на основе агара Difco – 10г/л) и синказный бульон для отмывки эритроцитов (Na_2HPO_4 – 5 г/л, K_2HPO_4 – 5 г/л, NH_4Cl – 18 г/л, Na_2SO_4 – 0,089 г/л, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,042 г/л, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ –

0,004 г/л, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,005 г/л, казеиновые кислоты – 10 г/л, сахара – 5 г/л).

Культирование клеточных линий проводили с использованием питательных сред: Игла MEM жидкой с добавлением 10 % сыворотки КРС (Биолот, Россия), с L-глутамином (Биолот, Россия); 199 жидкой, с L-глутамином (Биолот, Россия) и растворов: Дальбекко (DPBS) без Ca_2^+ и Mg_2^+ (Биолот, Россия); трипсина 0,25 % (Биолот, Россия); версена 0,02 % (Биолот, Россия).

Для получения холерного токсина, подготовки образцов и постановки методов использовали дистиллированную воду (дистиллятор «GFL 2004», Германия) и воду очищенную (УВОИ-«М-Ф» 1812F-6, Россия).

Для приготовления рабочих растворов использовали реактивы отечественного и зарубежного производства, соответствующие квалификации чистоты «о.с.ч.», «х.ч.», «ч.д.а.».

2.1.3 Лабораторные животные

В работе использовали клинически здоровых кроликов (*Oryctolagus cuniculus*) породы Шиншилла массой ($2,3 \pm 0,3$) кг, кроликов-сосунков (*Oryctolagus cuniculus*) породы Шиншилла (9 ± 1) суточного возраста, массой (120 ± 10) г.

Животные получены из питомника по разведению экспериментальных животных на базе ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [Европейская конвенция о защите позвоночных № 123], «Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских целях» [Каркищенко Н.Н., Грачева С.В., 2010], содержание экспериментальных животных осуществляли в соответствии с «Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утв.

Минздрав РФ 23.04.2003 г. [<http://www.scbmt.ru/mag/polojenie.pdf>]. Все протоколы были одобрены Комиссией по биоэтике ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Специфическую активность по анатоксиносвязыванию и специфическую безопасность ХА, а также активность ХТ определяли в каждой пробе на клинически здоровых взрослых кроликах [Okabe L., 1933; Craig J. P. *et al.*, 1966].

Контроль остаточной холерогенности ХА и определение токсигенных свойств производственных штаммов *V. cholerae* проводили на кроликах-сосунках [Dutta N.K., Habbu M.K., 1955].

2.1.4 Клеточные линии

В работе использовали клеточные линии: Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки) ООО «Биолот», Россия; СНО-К1 (овариальные клетки китайского хомячка) из Российской коллекции культур клеток позвоночных института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Микробиологические методы

Чистоту бактериальной культуры контролировали бактериоскопически в мазках с окраской по Граму, высевом на пластинки с агаром Хоттингера (рН 7,6) и в бульон Хоттингера (рН 7,6).

Для исследования методом АСМ и ТЭМ готовили бактериальную взвесь по Фармакопейному стандартному образцу Государственной фармакопеи Российской Федерации Стандартному образцу мутности бактериальных взвесей ФСО 3.1.00086 (ОСО 42-28-86) (5МЕ), соответствующему концентрации микроорганизмов 10^9 м.к./мл, и обеззараживали в 2,5 % растворе

глутаральдегида (BASF, Германия). После фиксации с экспозицией 2 ч при температуре (4 ± 1) °C обеззараженный препарат тщательно отмывали дистиллированной водой при 5500 g на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) в течение 15 мин с последующим удалением надосадка. На следующем этапе 5 мкл полученной суспензии помещали на покровное стекло и высушивали при температуре $(22,0\pm 2,0)$ °C. Подготовку проб для АСМ и ТЭМ проводили согласно методическим указаниям «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I-IV групп патогенности» [МУ 1.3.3103–13, 2013].

Изучение морфологических свойств клеток проводили на просвечивающем (трансмиссионном) электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit TWIN (120kV) (Чехия) и сканирующем зондовом микроскопе Solver P47 PRO (NT-MDT, Россия) с использованием кремниевых кантилеверов серии NSG01, обладающих резонансной частотой 120 кГц и константой жесткости 5,5 Н/м. Сканирование выполнялось в режиме прерывистого контакта следующими методами: рассогласования и отображения фазы. Обработку изображений проводили с помощью программного обеспечения к прибору Nova, которая дает возможность редактировать полученные данные, а также представлять их в дву- (2D) и трехмерном (3D) формате. Регистрировали ряд параметров клеток – длину, ширину, высоту бактерий, а также среднюю арифметическую среднеквадратичной шероховатости поверхности клеточной стенки.

Для цитологического окрашивания культуры клеток применяли метод по Романовскому-Гимзе. Раствор для окрашивания вносили в количестве 30 мкл на лунку, выдерживали (19 ± 1) мин, после чего промывали проточной водой и учитывали результат под инвертированным микроскопом «Биомед 3И» при увеличении ($\times 100$).

Концентрацию клеток в микробных взвесах культур определяли с помощью денситометра DEN-18 (Biosan, Латвия) и по Фармакопейному стан-

дартному образцу Государственной фармакопеи Российской Федерации Стандартному образцу мутности бактериальных взвесей ФСО 3.1.00086 (ОСО 42-28-86) (5МЕ) (ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, г. Москва) соответствующего года выпуска, что эквивалентно 1×10^9 м.к. в 1 мл.

Число генераций определяли по формуле:

$$x/x_0=2^n$$

где X_0 и X – начальная и конечная концентрация

$$n = 3,32 \log(x/x_0).$$

2.2.2 Биотехнологические методы

Культивирование штаммов холерного вибриона осуществляли на термостатируемом шейкере-инкубаторе Infors Multitron II (Infors, Швейцария) в колбах Эрленмейера разного объема (от 250 мл до 2000 мл); в лабораторном и пилотном биореакторах с рабочими объемами 1,0 л и 200,0 л, соответственно, с аэрацией и автоматической подкормкой глюкозой и аммиаком при $(32,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ и $(37,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$.

Компоненты вакцины – холероген-анатоксин и О-антиген получали из инактивированных формалином бульонных культур штаммов *V. cholerae* O1 569В и *V. cholerae* М-41 Огава путем осаждения сульфатом аммония с последующим центрифугированием при 15000 g (СЕРА Z81, Германия), диализом и лиофилизацией. Процессы культивирования производственных штаммов *V. cholerae*, получения лиофилизированных антигенных компонентов и готовой лекарственной формы холерной химической вакцины проводили в соответствии с ПР.

2.2.3 Биологические методы

Для определения активности ХТ методом кожной пробы по Крейгу готовили ряд последовательных двукратных разведений образцов бульонной культуры из биореактора в диапазоне 1:1000 до 1:512000 в пробирках с 0,9 % NaCl рН (7,3±0,1). Каждое разведение ХТ вводили в объеме по 0,1 мл шприцем строго внутрикожно кролику. Реакцию учитывали через (21,0±3,0) ч. Активность ХТ измеряли минимальной дозой, которая вызывает образование папулы в диаметре от 5 до 10 мм.

Для определения токсигенных свойств производственных штаммов-продуцентов использовали кроликов-сосунков, которым внутрикисечно вводили 0,5-1 мл специфически стерильных образцов реакторной культуры. Учет результатов проводили через (48,0±2,0) ч. При положительном результате (наличие токсигенных свойств) у животных отмечается выраженный «синдром холерогенности» в толстом кишечнике

Специфическую активность ХА определяли методом анатоксиносвязывания. Для постановки контроля ХА в объеме 5 мг разводили в 0,9 % NaCl и делали ряд двукратных разведений в диапазоне с 1:1000 до 1:14000. Далее из данных разведений по 0,2 мл переносили в чистые пробирки и добавляли по 0,2 мл СОП АХС и инкубировали 30 мин при температуре (37,0±0,2) °С. Затем в эти же пробирки добавляли по 0,4 мл СОП ХТ и инкубировали 30 мин при температуре (37,0±0,2) °С. Опыт сопровождали постановкой контроля определения 1 АЕ АХС на тех же кроликах. Для этого готовили разведения СОП АХС в 0,9 % NaCl в ряде пробирок (80 АЕ, 60 АЕ, 40 АЕ, 30 АЕ, 20 АЕ в 1 мл). Затем в стерильные пробирки переносили разведения по 0,2 мл каждого разведения, добавляли 0,9 % NaCl и 0,4 мл СОП ХТ, получая соответственно концентрацию 2 АЕ, 1,5 АЕ, 1 АЕ, 0,75 АЕ, 0,5 АЕ разведения СОП АХС в 0,1 мл. Инкубировали 30 мин при температуре (37,0±0,2) °С. Учет результатов осуществляли через (24,0±2,0) ч. За положительную реакцию принимали зону отека диаметром от 5 до 10 мм. Зона отека должна быть

равна зоне отека в контрольном ряду, где одна опытная доза СОП ХТ была соединена с 1АЕ СОП АХС.

Специфическую безопасность ХА определяли при введении внутрискожно кроликам по 0,1 мл из ряда последовательных разведений, начиная с 1:2000. Отсутствие папул или образование папулы диаметром до 10 мм свидетельствовали о специфической безопасности ХА.

Контроль остаточной холерогенности ХА проводили на кроликах-сосунках. На постановку одного образца использовали трех животных. Во время операции каждому из трех кроликов-сосунков одноразовым шприцем вводили внутрикисечно ХА в объеме 1 мл с активностью 100 000 ЕС раствором в 0,9 % NaCl. В течение $(48,0 \pm 2,0)$ ч не должно наблюдаться гибели животных. После этого времени кроликов-сосунков подвергали эвтаназии и вскрывали. У животных в толстом кишечнике не должно наблюдаться «синдрома холерогенности».

Приготовление монослоя клеточной культуры. Клетки линии СНО-К1 выращивали в среде Игла и 199 (1:1) с добавлением 10 % сыворотки КРС, клетки линии Vero выращивали в среде 199 с добавлением 10 % сыворотки КРС с соблюдением условий асептики.

Качество клеточного монослоя контролировали при помощи инвертированного микроскопа «Биомед 3И» (Россия). Для открепления клеток от поверхности использовали раствор трипсина и версена (соотношение 1:2). Клеточную суспензию добавляли во все лунки планшета в объеме 100 мкл. Планшеты с клетками инкубировали при $(37,0 \pm 0,2)$ °С и 5 % CO₂ в течение (20 ± 2) ч в CO₂-инкубаторе Sanyo (Япония).

Специфическое действие ХТ в исследуемых образцах оценивали по четырехбалльной системе:

++++ – 80-100 % клеток в поле зрения имеют специфически измененную морфологию, включая деструкцию клеток.

+++ – 60-70 % специфически измененных (удлиненных) клеток,

++ – 50 % специфически измененных и типичных клеток,

+ – менее 40 % специфически измененных на фоне типичных клеток,
- – единичные (не более 10 %) удлинённые клетки на фоне типичных клеток монослоя.

Положительным считали результат в лунках, где концентрация оставшегося (не связанного с АХС) ХТ вызывает специфические изменения у 50 % наблюдаемых клеток: удлинение, деформация, появление разветвленных отростков [Сальникова О.И., 1994; Guerrant R.L. *et al.*, 1974]. Последние лунки с положительным результатом на всех планшетах учитывали как показатели разведения препарата, соответствующее его специфической активности, например, 1:8000. Рассчитывали среднее арифметическое значение разведений (в трех повторностях) для каждой фракции.

2.2.4 Биохимические методы

Концентрацию белка определяли общепринятым методом по О. Lowry при 750 нм [Lowry O. *et al.*, 1951] с применением набора реактивов «Bio-Rad DC Protein Assay» (США).

Электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в присутствии додецил сульфата натрия проводили по U.K. Laemmli [Laemmli U.K., 1970] на приборе «Mini protean II» Bio-Rad (США). Разделение проводили в 4 % концентрирующем и 12 % разделяющем гелях в трис-глициновом буфере (рН 8,3), содержащем 0,1 % SDS в денатурирующих условиях. Использовали белковые маркеры молекулярных весов от 10 до 250 кДа Precision Plus Stead (Bio-Rad). Для обнаружения белков использовали окраску Кумасси синим R-250 (Диаэм, Германия). Для проведения гель-хроматографического анализа использовали комплект оборудования фирмы «Bio-Rad» (США). Использовали колонки размером 2,2×20 см и 3×45 см.

Измерение рН растворов и исследуемых образцов осуществляли с применением рН-метра-милливольтметра Oakton Benchtop Ion 510 (США).

Стерилизующую фильтрацию образцов осуществляли через фильтрующий элемент с размером пор 0,22 мкм (Sartorius, США).

2.2.5 Иммунохимические методы

Иммуноблоттинг проводили по методу Н. Towbin [Towbin Н., 1979]. Перенос белков с полиакриламидного геля после SDS-PAGE на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,22 мкм (Schleicher & Schuell, Германия) осуществляли электропереносом в трис-глициновом буфере (pH 8,3) при 350 мА в течение 1 ч при температуре $(18,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ на приборе Bio-Rad (США). После переноса мембрану блокировали в 3 % растворе БСА на NTS-буфере (pH 7,4). Инкубация проходила с СОП АХС (рабочее разведение 1:100) в течение 1 ч при температуре $(37,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$.

Реакцию диффузионной преципитации антигенов и антител проводили по методу Оухтерлони [Ouchterlony O., 1949]. В данной реакции использовали 1 % агар фирмы «Дифко» (США). Учет результатов проводили через 24-48 ч.

ХТ определяли с помощью GM₁ ELISA с использованием GM₁-моносиалоганглиозидов [Svennerholm A.M., Wiklund G., 1983]. При постановке анализа использовали полистироловые планшеты для ИФА (Медполимер, г. Санкт-Петербург). Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляли с помощью конъюгата (антитела диагностические против IgG (H+L) кролика, меченные пероксидазой, сухие производства НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи). В качестве положительного контроля использовали СОП ХТ, а отрицательным контролем являлась разводящая жидкость (ФСБ). Субстратным раствором являлся АВТС, содержащего перекись водорода. Учет результатов проводили с помощью планшетного фотометра iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм. Результат считали: положительным, если $\text{ОПобр} \geq \text{ОП(К-)} \times 2$; отрицательным, если $\text{ОПобр} < \text{ОПср(К-)} \times 2$ (ОПобр – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом).

Для определения продукции ХТ штаммами *V. cholerae* использовали иммуноферментную тест-систему ИФАХолХТ-М (производство института «Микроб»). Постановку реакции осуществляли согласно инструкции к тест-системе.

Методом РПИГ изучали способность штаммов *V. cholerae* продуцировать ХТ во внешнюю среду. Для этого изолированные колонии (50 колоний) методом реплик переносили на чашки с агаром Хоттингера рН (7,7±0,1) и синказной средой. Приготовление чашек для РПИГ: 1 % синказный агар разливали подложкой по 10 мл на чашку, наслаивали сверху синказный агар с эритроцитами (на 4,5 мл 1 % синказного агара добавляли 0,5 мл двукратно свежееотмытых в синказном бульоне эритроцитов барана). Чашки с посевами инкубировали (18±1) ч при (30,0±0,2) °С, после чего заливали полужидким агаром с добавлением 1 мл компонента морской свинки (ФГУП «НПО «Микроген», Россия) и 0,1 мл СОП АХС и инкубировали при температуре (37,0±0,2) °С в течение (3,0±1,0) ч. Вокруг макроколоний штамма *V. cholerae* 569В наблюдали зону иммунного гемолиза (3±1) мм, что свидетельствует о способности штамма продуцировать ХТ во внешнюю среду. За титр реакции принимали минимальное разведение образца ХТ, которое образует зону лизиса эритроцитов [Bramucci M. G., Holmes R. K., 1978; Шагинян И.А., Маракуша Б.М. 1983].

Получение конъюгата ЗНЧ и белка А *Staphylococcus aureus*. Приготовление коллоидного раствора золота с диаметром частиц 15-17 нм осуществляли по методу G. Frens [Frens, 1973]. «Золотое число» определяли по методике Жигмонди Р. [Жигмонди Р., 1933]. Для приготовления конъюгата в раствор коллоидного золота с оптимальным значением рН 7,0 добавляли при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке необходимое количество стафилококкового белка А (Sigma) в соотношении по объему от 1:10 до 1:320 в соответствии с выявленным «золотым числом». Для стабилизации полученного конъюгата добавляли 0,5 % раствор высокомолекулярного полимера ПЭГ-20000 в конечной концентрации 0,02 %.

При проведении ДИА ЗНЧ в качестве подложки (твердой фазы) применяли расчерченную квадратами нитроцеллюлозную мембрану с размерами пор 0,22 и 0,45 мкм (Sigma; Millipor; Владисарт). Фиксацию препаратов осуществляли в течение (15 ± 5) мин при температуре $(20,0 \pm 2,0)$ °С. Блокировку проводили в растворе 3 % БСА. После блокировки мембрану инкубировали с СОП АХС (рабочее разведение 1:100) в течение 1 ч при температуре $(37,0 \pm 0,2)$ °С. Далее вносили конъюгат на основе белка А *Staphylococcus aureus* и ЗНЧ. Учет результатов проводили визуально, учитывая то наибольшее разведение исследуемого образца, которое дает проявление реакции в виде четко окрашенного пятна [Тертон М. и др., 1991; Дыкман Л.А., Богатырев В.А., 1999; Дыкман Л.А. и др., 2008; Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г., 2011; Полтавченко А.Г. и др., 2016]. В качестве положительного контроля использовали СОП ХТ и очищенный О-Аг, а отрицательным контролем являлась разводящая жидкость (0,9 % NaCl).

2.2.6 Молекулярно-генетические методы

Подготовку проб для ПЦР осуществляли согласно методическим указаниям «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» [МУ 1.3.2569-09, 2010].

Присутствие в хромосоме гена *ctxA* у штаммов *V. cholerae* определяли с использованием тест-системы ГенХол для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (*ctxA*+) методом ПЦР (ГенХол) (производство института «Микроб») согласно инструкции к тест-системе. Выделение ДНК проводили согласно инструкции и набора к тест-системе. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 0,8 % агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл этидия бромида в камере для горизонтального электрофореза (Bio-Rad, США). Результаты ПЦР регистрировали с использованием фотодокументирующей системы «GelDoc 2000» (Bio-Rad, США).

Полногеномное секвенирование штаммов проводили на платформе геномного секвенатора Ion Torrent PGM (Thermo scientific, США) с использованием чипа Ion 318 Chip Kit и набора реагентов Ion PGM Hi-Q View Chef 400 Kit. Методом полногеномного секвенирования была исследована структура ДНК холерного вибриона на этапах культивирования. В работе приведены названия профагов, островов патогенности, генов и локусов, идентичность нуклеотидной последовательности которых проверялась на этапах производственного цикла культивирования штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В. Геномы изучаемых штаммов сравнивали с соответствующими нуклеотидными последовательностями референс-штаммов *V. cholerae* N16961 и *V. cholerae* 0395, взятыми из GeneBank, используя программу SeqAnalyzer 1.5.

2.2.7 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по стандартной методике определения грубых ошибок, рассчитывая среднее арифметическое значение (M), среднее квадратичное отклонение (sx) и стандартную ошибку среднего (mM). Коэффициент корреляции рассчитывали по Пирсону [Лакин Г. Ф., 1990]. Вычисления осуществляли с применением программы Microsoft Office Excel (Microsoft, США). Кривые линии роста бактериальной культуры строили с величиной достоверности аппроксимации $R^2 \geq 0,95$.

Все эксперименты, связанные с культивированием и постановкой микробиологических, биологических, иммунохимических методов, проводили не менее трех раз. Значения коэффициента корреляции Пирсона интерпретировали в соответствии со шкалой Чеддока: менее 0,3 – слабая; от 0,3 до 0,5 – умеренная; от 0,5 до 0,7 – заметная; от 0,7 до 0,9 – высокая; более 0,9 – весьма высокая.

Для анализа распределения данных использовались методы описательной статистики. Статистическую значимость полученных результатов находили и оценивали с использованием критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ [Гланц С., 1998; Кобзарь А.И., 2006].

Описание отдельных методических приемов приведено в главах диссертации с изложением результатов проведенных исследований.

ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСА МЕТОДОВ *IN VITRO* ДЛЯ КОНТРОЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИГЕНОВ НА ЭТАПАХ ПРОИЗВОДСТВА ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

В настоящее время при производстве холерной химической вакцины используют методы проверки специфической активности антигенных компонентов (ХТ, ХА) на лабораторных животных. Проведенный анализ литературных данных показал, что на данный момент разработано большое количество методов *in vitro* для детекции, количественного определения ХТ и индикации штаммов *V. cholerae* по признаку «токсигенность». Кроме того, можно отметить широкое использование методов *in vitro* и отсутствие методов *in vivo* с использованием животных при проведении контроля качества холерных вакцин за рубежом [The International Pharmacopoeia, 2020].

Задачей данного раздела является разработка критериев и алгоритма применения методов *in vitro* для контроля активности антигенов (ХТ и ХА) на этапах производства и в готовой лекарственной форме.

3.1 Разработка способа применения иммунохимических и молекулярно-генетических методов для определения специфической активности холерного токсина, холероген-анатоксина и О-антигена

В соответствии с ПР на производство холерной химической вакцины методами контроля специфической активности ХТ в культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569В являются:

1. кожная проба по Крейгу на взрослых кроликах. Метод позволяет количественно определить содержание ХТ. Время постановки и учета результатов составляет 24 ч. На один анализ используют двух кроликов;
2. определение токсигенности в реакторной культуре на модели кроликов-сосунков по наличию выраженного «синдрома холерогенности». Являет-

ся качественной реакцией. Время постановки и учета результатов составляет 72 ч. Для контроля образца культуры из каждого биореактора используют трех кроликов-сосунков;

3. РДП с СОП АХС. Метод позволяет подтвердить идентичность ХТ в реакторной культуре, является полуколичественной реакцией, время постановки и учета результата составляет 24 ч.

Ежегодно в начале цикла производства холерной химической вакцины проводится проверка основных свойств производственного штамма *V. cholerae* 569В. Для подтверждения токсигенных свойств штамма применяются метод ПЦР с электрофоретическим учетом результатов (определяется наличие в хромосоме гена *ctxA*) и метод РПИГ для определения способности продуцировать ХТ во внешнюю среду.

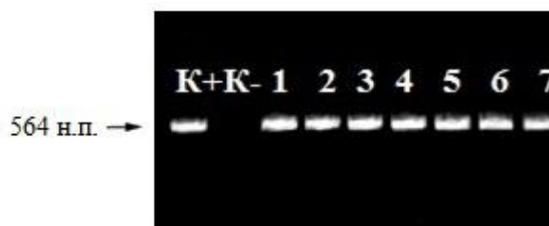
Для определения специфической активности антигенов была изучена возможность применения следующих методов: РПИГ, ПЦР, GM₁ ELISA, ДИА ЗНЧ. Ниже представлены методики проведения экспериментов.

Для определения признака «токсигенность» штамма *V. cholerae* 569В по наличию *ctxA*-гена применяли метод ПЦР с помощью тест-системы ГенХол.

В работу были взяты образцы реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В в стационарной фазе роста (10 ч). Пробоподготовку проводили следующим образом: образцы разводили 0,9 % NaCl до концентрации 1 млрд/мл, для анализа брали 0,1 мл суспензии, прогревали 30 мин при температуре 56 °С, затем центрифугировали 15 мин при 5500 g. В осадок добавляли дистиллированную воду в объеме 1 мл и перемешивали. Затем кипятили 10 мин при температуре 100 °С, после чего центрифугировали 2 мин при 8000 об/мин. Далее по инструкции к тест-системе ГенХол добавляли реактивы с учетом положительного и отрицательного контроля. Все пробы перемешивали и помещали в амплификатор Терцик (ДНК-технология, Россия) и проводили амплификацию по матричной схеме: предварительная денатурация ДНК при температуре (94±0,1) °С в течение 5 мин; 35 циклов, включающих в

себя: денатурацию ДНК при температуре $(94\pm 0,1)$ °С в течение 30 с, отжиг праймеров – при температуре $(60\pm 0,1)$ °С в течение 30 с, синтез комплементарной цепи – при температуре $(72\pm 0,1)$ °С в течение 30 с. После последнего цикла пробирки прогревали в течение 7 мин при температуре $(72\pm 0,1)$ °С. После термоциклирования к продуктам амплификации добавляли по 4 мкл буферного раствора для нанесения проб, перемешивали и по 15 мкл переносили в лунки геля и проводили электрофорез (30 ± 5) мин при градиенте напряжения 10 В/см до прохождения лидирующего красителя $2/3$ длины трека. По окончании электрофореза агарозный гель помещали на 10 мин в раствор бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл для окрашивания ПЦР-продукта. Учет результатов проводили с использованием фотодокументирующей системы «GelDoc 2000» (Bio-Rad, США). Результаты оценивали по наличию фрагментов ДНК, полосы которых располагались на том же уровне геля, что и полоса в положительном контроле с препаратом ДНК.

В 24 образцах были выявлены фрагменты ДНК размером полосы 564 н.п., соответствующие нуклеотидной последовательности *ctxA* гена, кодирующего А-субъединицу холерного токсина. Это свидетельствует о содержании полноценного гена *ctxA* при глубинном культивировании штамма *V. cholerae* 569В (рисунок 1). На рисунке 1 показана демонстрация только 7 образцов, так как все образцы были типичными.



K+ – положительный контроль; K - – отрицательный контроль;

1-7 – образцы реакторной культуры в стационарной фазе роста

Рисунок 1 – Выявление фрагмента ДНК размером полосы 564 н.п. у штамма *V. cholerae* 569В в образцах реакторной культуры с использованием тест-системы ГенХол методом полимеразной цепной реакции

Далее была изучена возможность применения метода РПИГ для определения токсигенности штамма *V. cholerae* 569В в образцах реакторной культуры.

Перед постановкой анализов образцы реакторной культуры в объеме 50 мл центрифугировали при 10000 g 15 мин на центрифуге Sigma 4-16 (Германия) с последующей стерилизующей фильтрацией. Далее делали двукратные разведения образцов в диапазоне 1:2 до 1:1024 в 0,9 % растворе NaCl в объеме 0,1 мл. На поверхность чашки Петри с синказным агаром с эритроцитами дозатором переменного объема наносили по 10 мкл разведенных образцов. Чашки инкубировали в течение (3 ± 1) ч при температуре $(37,0 \pm 0,2)$ °С. После чего наслаивали 5 мл 0,5 % синказного агара, содержащего 1 мл компонента морской свинки и 0,2 мл СОП АХС, с дальнейшей инкубацией при температуре $(37,0 \pm 0,2)$ °С в течение (3 ± 1) ч. Анализ проводили в трех повторях. На поверхности синказного агара на месте нанесенного образца, содержащего ХТ, наблюдали зону иммунного лизиса диаметром (3 ± 1) мм. За титр реакции принимали минимальное разведение образца, которое образует зону лизиса эритроцитов.

На следующем этапе была изучена возможность применения высокочувствительного и воспроизводимого метода GM₁ ELISA для определения

специфической активности ХТ в образцах реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В, в основу которого положена схема сэндвич-варианта ИФА с использованием GM₁-ганглиозидов, обладающих сродством к иммуногенной В-субъединице ХТ. Пробоподготовку проводили следующим образом: образцы реакторной культуры в объеме 50 мл центрифугировали при 10000 g 15 мин на центрифуге Sigma 4-16 (Германия) с последующей стерилизующей фильтрацией через фильтрующий элемент с диаметром пор 0,22 мкм.

Планшеты предварительно сенсibilizировали GM₁-ганглиозидами (рабочее разведение 5 мкг/мл в ФСБ) по 100 мкл на лунку и инкубировали при температуре (4,0±1,0) °С в течение (18±1) ч. Затем планшет трехкратно отмывали в ФСБ с Твин-80 от несвязавшихся ганглиозидов. Для блокировки свободных участков связывания во все лунки планшета добавляли по 100 мкл 0,5 % БСА и инкубировали 30 мин при температуре (37,0±0,2) °С. Далее трехкратно промывали ФСБ с Твин-80 и вносили образцы реакторной культуры, двукратно разведенные в диапазоне 1:2 до 1:1024 в ФСБ в объеме 0,1 мл. В качестве положительного контроля служил СОП ХТ, отрицательного – ФСБ. Плашку инкубировали 1 ч при температуре (37,0±0,2) °С. После инкубации лунки планшета трехкратно промывали ФСБ с Твин-80 и в каждую лунку добавляли по 100 мкл СОП АХС (рабочее разведение 1:100). Затем трехкратно промывали ФСБ с Твин-80 и в каждую лунку добавляли по 100 мкл антител против IgG (H+L) кролика, меченных пероксидазой (рабочее разведение 1:10000). Далее трехкратно промывали ФСБ с Твин-80 и в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратной смеси, содержащей АВТS и перекись водорода и выдерживали при температуре (20,0±2,0) °С в течение (12±2) мин до появления зелено-голубого окрашивания, после чего производили учет результатов. Анализ проводили в трех повторах. Учет результатов осуществляли с использованием планшетного фотометра iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм. Результат считали положительным, если ОПобр ≥ ОП(К-)×2. Результат анализа считали отрицательным, если ОПобр < ОПср(К-)×2.

Все 24 образца реакторной культуры в стационарной фазе роста параллельно проверяли на модели кроликов-сосунков. В результате был выявлен выраженный «синдром холерогенности» в толстом кишечнике кроликов-сосунков.

Далее на тех же образцах была изучена возможность применения ДИА ЗНЧ для определения специфической активности ХТ, так как данный метод является высокочувствительным, позволяет получать результаты в течение короткого времени и не требует специального оборудования.

Пробоподготовка заключалась в центрифугировании образцов реакторной культуры в объеме 50 мл при 10000 g в течение 15 мин на центрифуге Sigma 4-16 (Германия) с последующей стерилизующей фильтрацией через фильтрующий элемент с диаметром пор 0,22 мкм.

На нитроцеллюлозную мембрану наносили по 0,3 мкл разведенных образцов реакторной культуры в диапазоне от 1:2 до 1:1024 и фиксировали при температуре $(24,0 \pm 2,0)$ °С в течение (15 ± 5) мин. После чего инкубировали в 3 % БСА 30 мин при $(37,0 \pm 0,2)$ °С для блокировки свободных участков мембраны. После трехкратной отмывки в 9 % NaCl с Твин-80 мембрану погружали в СОП АХС (рабочее разведение 1:100) и проводили инкубацию при $(37,0 \pm 0,2)$ °С в течение 1 ч. Далее трехкратно отмывали в 9 % NaCl с Твин-80 и погружали мембрану в конъюгат на основе стафилококкового белка А, меченного наночастицами коллоидного золота для выявления связавшихся с антигеном антител. Анализ проводили в трех повторах. Учет результатов проводили визуально, учитывая то наибольшее разведение исследуемого образца, при котором регистрировали четко различимое цветное пятно. Время постановки составляло 2 ч.

Результаты определения активности ХТ различными методами в образцах культуральной жидкости реакторной культуры 24 независимых выращивания штамма *V. cholerae* 569В представлены в таблице 4.

Таблица 4 – 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	Крейг* (<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»; *** «+» – наличие гена *ctxA* в толстом кишечнике кролика-сосунка; «-» – не определяли.

Полученные данные позволяют утверждать, что методом РПИГ возможно определять активность ХТ в образцах реакторной культуры с чувствительностью 0,2 мкг/мл. Метод *in vivo* на модели кроликов-сосунков по времени занимает 48 ч, в то время как методом РПИГ можно получить результат в течение 6 ч без использования животных. Применение метода GM₁ ELISA также позволяет определять активность ХТ в образцах реакторной культуры при культивировании *V. cholerae* 569В. Чувствительность данного метода составляет 0,1 нг/мл. Получить результат возможно через (5±1) ч.

Коэффициент корреляции Пирсона между результатами GM₁ ELISA и кожной пробы по Крейгу составил 0,96, что свидетельствует об очень высокой корреляции; между результатами РПИГ и кожной пробы по Крейгу – 0,77, что также свидетельствует о высокой корреляции полученных результатов.

Коэффициент корреляции Пирсона между результатами кожной пробы по Крейгу и ДИА ЗНЧ составил 0,87, что свидетельствует о высокой корреляции между методами.

В производственном цикле ХА – специфический активный компонент холерной химической вакцины получают путем формоловой детоксикации ХТ, содержащегося в безмикробном центрифугате специфически стерильной культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569В. Формоловая детоксикация ХТ проходит в течение (30±3) сут при температуре (10,0±2,0) °С и рН (7,0±0,2), с постоянной концентрацией формалина 0,2 %. Из детоксицированной культуральной жидкости ХА получают путем осаждения сульфатом аммония. В соответствии с ПР количество ХА определяется по специфической активности антигена в реакции анатоксиносвязывания на кроликах [Okabe L., 1933]. Данный метод, проводимый на животных (кроликах), весьма трудоемок и длителен в постановке. На проверку одной серии ХА берут двух взрослых кролика, время постановки анализа составляет 24 ч.

Следующим этапом исследования была оценка возможности использования ДИА ЗНЧ для определения специфической активности ХА. В работе

использовали лиофилизированный, специфически стерильный препарат ХА. Проанализированы образцы 6 серий ХА, анализ проводили в трех повторах.

Пробоподготовка заключалась в следующем: готовили раствор ХА с концентрацией 5 мг/мл по сухому весу в 0,9 % NaCl. Далее наносили на нитроцеллюлозную мембрану разведенные в 0,9 % NaCl серии ХА в диапазоне от 1:2 до 1:512 по 0,3 мкл и фиксировали при температуре $(24,0 \pm 2,0)$ °С в течение (10 ± 2) мин. После чего инкубировали в 3 % БСА 30 мин при $(37,0 \pm 0,2)$ °С для блокировки свободных участков связывания на мембране, после трехкратной отмывки в 0,9 % NaCl с Твин-80 мембрану инкубировали в специфической СОП АХС (рабочее разведение 1:100) при температуре $(37,0 \pm 0,2)$ °С. После чего мембрану трехкратно отмывали в 0,9 % NaCl с Твин-80. Затем выявляли связавшиеся с антигеном антитела с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного наночастицами коллоидного золота. Учет результатов проводили визуально, сразу после проявления пятен. За титр антигена в препарате принимали то наибольшее разведение, при котором регистрировали четко различимое пятно. Время постановки составляло 2 ч. Полученные данные представляют средние показатели 3-5 определений (таблица 5).

Таблица 5 – Специфическая активность холерогена-анатоксина при определении в ДИА ЗНЧ и реакции анатоксиносвязывания (n=3)

№ образца	ДИА ЗНЧ* (<i>in vitro</i>)	По анатоксиносвязыванию в ед. ЕС* (<i>in vivo</i>)
1	170,6±42,6	4000
2	213,3±42,6	8000
3	170,6±42,6	4000
4	213,3±42,6	8000
5	426,6±85,3	10000
6	682,6±170,6	10000

Примечание: * реципрокный титр

Коэффициент корреляции Пирсона между результатами ДИА ЗНЧ и реакции анатоксиносвязывания составил 0,8, что свидетельствует о высокой корреляции.

На следующем этапе была оценена эффективность применения ДИА ЗНЧ для определения специфической активности ХА в готовом препарате холерной химической вакцины. Был проведен анализ серий готовой лекарственной формы холерной химической вакцины с помощью ДИА ЗНЧ в сравнении с реакцией анатоксиносвязывания на кроликах (время постановки составляет 24 ч). В работе использовали образцы 7 серий готовой лекарственной формы химической холерной вакцины, анализ каждой серии по показателю активности проводили в трёх повторах. Пробоподготовка заключалась в растворении трех таблеток холерной химической вакцины в 75 мл 0,9 % NaCl и центрифугировании в течение (3 ± 1) мин при 8000 об/мин. Затем делали ряд последовательных двукратных разведений надосадочной жидкости в диапазоне с 1:2 до 1:1024 с учетом положительного (серия ХА) и отрицательного (разводящая жидкость – 0,9 % NaCl) контролей и наносили на мембрану по 0,3 мкл. Далее постановка ДИА ЗНЧ осуществлялась согласно описанной выше методике. В качестве специфической сыворотки использовали СОП АХС (рабочее разведение 1:100). Время постановки составило 2 ч для ДИА ЗНЧ. Активность ХА указанных серий параллельно определяли на взрослых кроликах методом анатоксиносвязывания, согласно ПР.

Установлено, что использование разработанного методического подхода к определению активности ХА в ДИА ЗНЧ позволяет оценивать указанный показатель в готовом препарате холерной вакцины (таблица 6).

Таблица 6 – Специфическая активность холерогена-анатоксина в готовой лекарственной форме при определении в ДИА ЗНЧ и реакции анатоксиносвязывания (n=3)

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

Примечание: * реципрокный титр

Коэффициент корреляции Пирсона между результатами ДИА ЗНЧ и реакции анатоксиносвязывания составил 0,9, что свидетельствует о сопоставимости методов.

Таким образом, в ходе проведенного исследования экспериментально обоснована возможность применения ДИА ЗНЧ для оценки активности ХА в готовой лекарственной форме вакцины.

Необходимо отметить преимущество предлагаемого метода ДИА ЗНЧ. Для проведения непрямого дот-иммуноанализа с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного наночастицами коллоидного золота требуется всего 0,3 мкл материала, время анализа не более двух часов, учет результатов визуальный. Процедура получения и применения иммуноконъюгата проста и универсальна, имеется возможность исследования антигенов при наличии специфических сывороток. Кроме того, так как в настоящее время нет единого метода определения активности антигенов на этапах получения лиофилизированных полуфабрикатов холерной химической вакцины, использование предложенного варианта ДИА ЗНЧ позволяет стандартизировать определение активности различных фракций. При соблюдении стандартных условий постановки реакции ДИА ЗНЧ позволяет проводить

быстрый сравнительный анализ активности антигенов и выражать ее в сопоставимых условных единицах.

Таким образом, результаты проведенных исследований по оценке специфической активности ХТ в тестах *in vitro* позволили определить и внести в промышленный регламент количественные критерии пригодности полуфабриката – реакторной культуры *V. cholerae* 569В для дальнейшего использования в производственном цикле: положительная реакция в каждой пробе по Крейгу в разведении не менее 1:2000 (в соответствии с ПР), РПИГ – 1:8, GM₁ ELISA – 1:8 и ДИА ЗНЧ – 1:8. Активность лиофилизированного ХА в ДИА ЗНЧ должна быть не ниже 1:8. По полученным данным определено, что активность ХА в ДИА ЗНЧ должна быть не ниже 1:512 в готовой лекарственной форме, что соответствует активности в реакции анатоксиносвязывания не ниже 1:80000 (в соответствии с НД данное значение является показателем минимальной активности ХА в готовой лекарственной форме).

В соответствии с ПР методом контроля специфической активности О-Аг, продуцируемого *V. cholerae* М-41 при глубинном культивировании, является РДП с холерной О1-сывороткой. Недостатком данного метода является длительность по времени постановки и учета результата (24 ч). Разработанным методическим подходом показана возможность использования ДИА ЗНЧ для оценки активности О-Аг, продуцируемого *V. cholerae* М-41 в стационарной фазе роста, для чего были исследованы 10 образцов реакторной культуры. В качестве сыворотки к О-Аг использовали холерную О1-сыворотку. Пробоподготовка и постановка анализа осуществлялись аналогично, как для образцов реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В. Параллельно с ДИА ЗНЧ определяли активность О-Аг с применением РДП (таблица 7).

Таблица 7 – Специфическая активность О-Аг в образцах реакторной культуры штамма *V. cholerae* М-41 при определении в ДИА ЗНЧ и РДП (n=3)

№ образца	ДИА ЗНЧ*	РДП*
1	341,3±85,3	10,6±2,6
2	1365,3±341,3	32,0±0
3	853,3±170,6	26,6±5,3
4	426,6±85,3	21,3±5,3
5	170,6±42,6	13,3±2,6
6	341,3±85,3	10,6±2,6
7	170,6±42,6	6,6±1,3
8	106,6±21,3	8,0±0
9	682,6±170,6	13,3±2,6
10	341,3±85,3	10,6±2,6

Примечание: *реципрокный титр

Коэффициент корреляции Пирсона между результатами ДИА ЗНЧ и РДП составил 0,72. Полученные результаты позволяют сделать вывод о применении разработанного методического подхода с использованием ДИА ЗНЧ для определения активности О-Аг взамен РДП, что позволит сократить время анализа.

На следующем этапе проводилась работа по оценке возможного использования GM₁ ELISA для оценки специфической безвредности готовой лекарственной формы. Согласно НД специфическая безвредность готовой лекарственной формы оценивается на взрослых кроликах: при внутрикожном введении вакцины в разведении не более 1:6000 (60000 ЕС/мл) не должны образоваться папулы.

Для исследования были взяты образцы 8 серий вакцины. Параллельно определяли специфическую безвредность на взрослых кроликах. Для постановки анализа делали ряд разведений каждой серии вакцины в 0,9 % NaCl 40000 ЕС/мл, 60000 ЕС/мл, 80000 ЕС/мл, 100000 ЕС/мл, 120000 ЕС/мл, 140000 ЕС/мл и вносили по 100 мкл, начиная с наименьшего разведения, в лунки планшетов, предварительно сенсibilизированных GM₁-ганглиозидами. Планшеты инкубировали при температуре (37,0±0,2) °С в те-

чение 1 ч. В качестве положительного контроля использовали СОП ХТ, в качестве отрицательного контроля – 0,9 % NaCl. Специфичность действия вакцины подтверждали определением 1 антитоксической единицы (1 АЕ) СОП АХС. Для этого готовили разведения СОП АХС в 0,9 % NaCl, содержащие 80 АЕ, 60 АЕ, 40 АЕ, 30 АЕ, 20 АЕ в 1 мл. К 0,2 мл каждого разведения СОП АХС добавляли 0,2 мл 0,9 % NaCl и 0,4 мл СОП ХТ, получая соответственно концентрацию 2 АЕ, 1,5 АЕ, 1 АЕ, 0,75 АЕ, 0,5 АЕ разведения СОП АХС в 0,1мл. Смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре $(37,0\pm 0,2)$ °С и вносили в лунки параллельно с исследуемыми образцами по 100 мкл, начиная с 2 АЕ. Далее трехратно промывали в ФСБ с Твин-80 и в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратной смеси, содержащего перекись водорода и АВТS и выдерживали при температуре $(20,0\pm 2,0)$ °С в течение (12 ± 2) мин до появления гомогенного зелено-голубого раствора, после чего производили учет результатов. Анализ проводили в трех повторах. Учет результатов осуществляли с использованием планшетного фотометра iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм.

При анализе всех взятых в работу сериях вакцины в каждой пробе на кроликах в разведении не более 1:6000 (60000 ЕС/мл) папулы не образовались, отсутствовало специфическое окрашивание и при анализе указанных образцов в GM₁ ELISA. В лунке с положительным контролем наблюдалось зелено-голубое окрашивание. Это указывает на то, что вакцина специфически безопасна.

В результате проведенных исследований разработан нормативный показатель качества промежуточного продукта производства – ХТ. Предлагается заменить при производстве холерной химической вакцины метод определения токсигенности на животных на высокочувствительные и сопоставимые методы *in vitro* – экспрессный метод РПИГ и наличие *ctxA*-гена методом ПЦР. Применение сочетания методов ПЦР и РПИГ позволило подтвердить токсигенность культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569В методами

in vitro и на данном этапе производства холерной химической вакцины отказаться от использования животных.

3.2 Экспериментальное обоснование использования перевиваемых клеточных линий для контроля специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина

В литературных источниках приводятся результаты исследований, свидетельствующие о возможности использования перевиваемых клеточных культур для тестирования активности антигенов. Установлено, что по чувствительности они сопоставимы с разрешающей способностью биопробы [Сальникова О.И., 1994; Маркина О.В. и др., 2007; Фрешни Р.Я., 2010; Дмитруха Н.Н., 2013].

Для изучения возможности использования перевиваемых клеточных линий для контроля специфической активности ХТ на этапе культивирования были взяты образцы реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В в стационарной фазе роста при глубинном культивировании.

На первом этапе работы была изучена активность ХТ в полученных образцах на двух клеточных линиях – Vero и СНО-К1. В качестве метода сравнения использовали биологический метод – кожную пробу по Крейгу, постановку которого проводили на взрослых кроликах в соответствии с ПР.

Пробоподготовка: образцы реакторной культуры в количестве 50 мл центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин на высокоскоростной центрифуге Sigma (Германия), затем проводили стерилизующую мембранную фильтрацию (0,22 мкм). В работе использовали специфически стерильные образцы.

Подготовку монослоя перевиваемых клеточных культур проводили по методике, описанной в разделе «Материалы и методы». После формирования монослоя в лунках удаляли питательную среду при помощи многоканального дозатора. Вносили по 100 мкл свежей питательной среды Игла и 199 (1:1) без

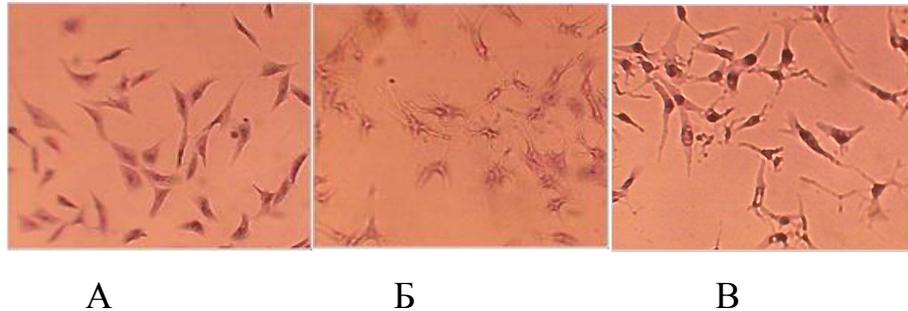
сыворотки крупного рогатого скота. В первые лунки каждого ряда вносили по 100 мкл исследуемых образцов, разведенных 1:10 в питательной среде, далее титровали двукратно до конца ряда по 100 мкл в диапазоне от 1:10 до 1:24800. В качестве положительного контроля использовали СОП ХТ, в качестве отрицательного контроля – интактные клетки.

Для подтверждения специфичности действия образца проводили контроль специфичности – к исследуемым образцам добавляли СОП АХС в соотношении 1:1. Смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,2)$ °С. Предварительно определили титр разведения СОП АХС следующим образом: готовили пятикратные разведения СОП АХС от 1:5 до 1:625, далее к каждому разведению добавляли по 0,4 мл СОП ХТ. Смесь выдерживали 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,2)$ °С. После инкубации титровали параллельно СОП ХТ и вносили в лунки с культурой клеток. Специфичность действия ХТ, содержащегося в исследуемых образцах, подтверждалась нейтрализацией найденным разведением СОП АХС.

Планшет закрывали и помещали в CO_2 -инкубатор с 0,5 % CO_2 при температуре $(37,0 \pm 0,2)$ °С. Учет результатов проводили через (18 ± 2) ч с помощью инвертированного микроскопа после предварительного окрашивания по Романовскому-Гимзе. Активность ХТ оценивали путем подсчета процента содержания измененных и типичных клеток в лунке. Произвольно выбирали три поля зрения по 100 клеток. За токсическую концентрацию принимали минимальную концентрацию ХТ, которая вызывает специфические изменения у 50 % наблюдаемых клеток. Учитывали следующие специфические изменения: общей морфологии (удлинение, деформация, появление разветвленных отростков), лизис, нарушение монослоя. Активность ХТ выражали в титре, соответствующем максимальному разведению образца, при котором наблюдаются специфические изменения в культуре клеток.

Для исследования цитотоксичности образцов, содержащих ХТ, на клеточной линии Vero определяли изменение общей морфологии, лизис, нару-

шение монослоя. Содержание белка в исследуемых пробах составило около $(6,0 \pm 0,12)$ мг/мл. Все 7 образцов вызывали специфическое изменение клеток: удлинение, деформация, появление разветвленных отростков (рисунок 2).



А – интактные клетки Vero (контроль отрицательный);

Б – воздействие СОП ХТ на клетки Vero (контроль положительный);

В – воздействие образца реакторной культуры, содержащего ХТ,
на клетки Vero

Рисунок 2 – Определение специфической активности ХТ с использованием культуры клеток Vero ($\times 100$)

Установлено, что наименее активным по всем тестам был образец № 7, а наиболее токсичным для линии клеток Vero оказался образец № 1, в то время как активность данного образца в каждой пробе по Крейгу не отличалась от большинства образцов. Результаты определения специфической активности ХТ в образцах реакторной культуры восьми независимых выращиваний штамма *V. cholerae* 569В представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты определения специфической активности ХТ штамма *V. cholerae* 569В в образцах реакторной культуры в тестах на клетках перевиваемой линии Vero и в каждой пробе по Крейгу (n=3)

№ образца	Крейг* усл.ед. (<i>in vivo</i>)	Активность на клетках Vero* (<i>in vitro</i>)
1	24000	$1066,6 \pm 213,3$
2	24000	$533,3 \pm 106,6$

3	32000	266,6±53,3
4	192000	533,3±106,6
5	64000	426,6±106,6
6	192000	533,3±106,6
7	2000	213,3±53,3
8	192000	266,6±53,3

Примечание: * реципрокный титр

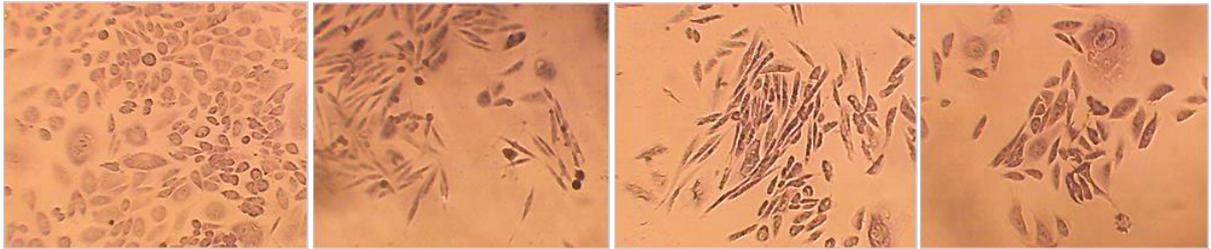
При сравнении данных, полученных при определении специфической активности ХТ в образцах реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В с использованием клеточной линии Vero и в каждой пробе по Крейгу определена статистически незначимая, слабая корреляция (коэффициент Пирсона – 0,1).

В связи с этим, были проведены исследования с использованием перевиваемой линии клеток СНО-К1, которая, по литературным данным, является наиболее чувствительной в отношении ХТ и позволяет выявлять до 20-30 пг/мл токсина [Сальникова О.И., 1994; Маркина О.В. и др., 2007; Фрешни Р.Я., 2010; Дмитруха Н.Н., 2013]. ХТ вызывает специфическое удлинение клеток данной линии.

При изучении активности ХТ на линии клеток СНО-К1 содержание белка во всех исследуемых образцах составило (4,0±0,1) мг/мл. Пробоподготовку и постановку анализа на перевиваемой линии клеток СНО-К1 проводили аналогично линии клеток Vero. Результаты анализа специфической активности ХТ в образцах реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В восьми независимых выращиваний с использованием культуры клеток СНО-К1 приведены на рисунке 3 и в таблице 9. На рисунке 3 продемонстрировано воздействие ХТ на клетки СНО-К1.

Установлено, что низкая специфическая активность образца № 3, определяемая по каждой пробе по Крейгу (1:24000) подтверждается и на модели линии клеток СНО-К1 (1:80). В образце № 4, показавшем высокую активность ХТ по каждой пробе по Крейгу (1:128000), на модели линии клеток

СНО-К1 также определен высокий титр (1:1280), что составило 0,32 мкг белка на лунку.



А

Б

В

Г

А – интактные клетки СНО-К1 (контроль отрицательный);

Б – воздействие СОП ХТ на клетки СНО-К1(контроль положительный);

В – воздействие образца реакторной культуры, содержащего ХТ,
на клетки СНО-К1;

Г – воздействие СОП АХС + образец реакторной культуры на клетки
СНО-К1 (контроль специфичности).

Рисунок 3 – Определение специфической активности ХТ с
использованием культуры клеток СНО-К1 ($\times 100$)

Таблица 9 – Результаты определения специфической активности ХТ в образцах реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В на клетках перевиваемой линии СНО-К1 и в каждой пробе по Крейгу (n=3)

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

Примечание: * реципрокный титр

Установлено, что значения активности ХТ в исследованных образцах реакторной культуры, определенные на кроликах и с использованием перевиваемой линии клеток, сопоставимы. Коэффициент корреляции Пирсона между методом кожной пробы по Крейгу и цитотоксичностью на линии клеток СНО-К1 составил 0,93. Полученные результаты (таблица 9 и рисунок 3) показали эффективность применения клеточной линии СНО-К1 при определении наличия и уровня специфической активности ХТ в образцах реакторной культуры при производстве холерной химической вакцины.

С учетом полученных результатов в дальнейшей работе для постановки теста *in vitro* использовали перевиваемую клеточную линию клеток СНО-К1.

Следующим этапом исследования была оценка возможности использования перевиваемой клеточной линии СНО-К1 для определения специфической активности ХА. В работе использовали лиофилизированный, специфически стерильный препарат ХА. Проанализированы образцы 8 серий ХА, анализ проводили в трех повторах. В качестве метода сравнения использовали реакцию анатоксиносвязывания на кроликах, постановку которой проводили согласно ПР. Специфическую активность ХА в обоих случаях выражали в единицах связывания (ЕС) – количество анатоксина, которое целиком связывается с 1 АЕ/мл СОП АХС.

Пробоподготовка для анализа специфической активности заключалась в том, что готовили раствор ХА с концентрацией 1 мг/мл по белку в 0,9 % NaCl. Далее делали ряд двукратных разведений в 0,9 % NaCl в диапазоне от 1:1000 до 1:14000. К 0,2 мл каждого разведения добавляли по 0,2 мл СОП АХС в концентрации 80 АЕ/мл. Пробирки встряхивали и помещали на 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,2)$ °С. Далее в каждую пробирку вносили по 0,4 мл СОП ХТ. Пробирки встряхивали и инкубировали 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,2)$ °С.

Подготовку монослоя перевиваемой клеточной культуры СНО-К1 проводили по методике, описанной в разделе «Материалы и методы». После формирования монослоя в лунках удаляли питательную среду при помощи

многоканального дозатора. Вносили по 100 мкл свежей питательной среды Игла и 199 (1:1) без сыворотки крупного рогатого скота. В подготовленные лунки планшета вносили образцы по 100 мкл, начиная с последнего разведения 1:14000. Определение активности ХА проводили на 3 планшетах, по 2 ряда на каждый образец. Специфичность действия образца подтверждали определением 1 антитоксической единицы (1 АЕ) СОП АХС. Для этого готовили разведения СОП АХС в 0,9 % NaCl, содержащие 80 АЕ, 60 АЕ, 40 АЕ, 30 АЕ, 20 АЕ в 1 мл. К 0,2 мл каждого разведения СОП АХС добавляли 0,2 мл 0,9 % NaCl и 0,4 мл СОП ХТ, получая соответственно концентрацию 2 АЕ, 1,5 АЕ, 1 АЕ, 0,75 АЕ, 0,5 АЕ разведения СОП АХС в 0,1 мл. Смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ и вносили в лунки параллельно с исследуемыми образцами по 100 мкл, начиная с 2 АЕ. Планшеты помещали в CO_2 -инкубатор при температуре $(37,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ и 5 % CO_2 .

Положительным считали результат в лунках, где концентрация несвязавшегося с СОП АХС токсина вызывает специфические изменения у 50 % наблюдаемых клеток. Учитывали следующие специфические изменения: удлинение, деформация, появление разветвленных отростков. Последние лунки с положительным результатом на всех планшетах учитывали как показатели разведения препарата, соответствующее его специфической активности. Рассчитывали среднее арифметическое значение разведений (в трех повторях). Наличие взаимосвязи между результатами определения специфической активности, полученными разными методами, оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона.

Определение специфической активности ХА с использованием культуры клеток СНО-К1 показало специфическое удлинение клеток при взаимодействии с ХТ, что наблюдали в лунках с положительным контролем и реакционной смесью (ХА+СОП ХТ+СОП АХС) (рисунок 4). На рисунке 4 показана демонстрация клеток СНО-К1 под воздействием ХА, так как все образцы были типичными.



А

Б

В

А – интактные клетки CHO-K1 (контроль отрицательный);

Б – воздействие СОП ХТ на клетки CHO-K1 (контроль положительный);

В – воздействие реакционной смеси (ХА+СОП ХТ+СОП АХС) на клетки CHO-K1

Рисунок 4 – Определение специфической активности ХА с использованием культуры клеток CHO-K1 ($\times 100$)

Результаты определения специфической активности ХА методами *in vivo* и *in vitro* по анатоксиносвязыванию представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты определения специфической активности ХА в реакции анатоксиносвязывания в тестах на клетках перевиваемой линии CHO-K1 и в каждой пробе на кроликах (n=3)

№ образца	Анатоксиносвязывание* по ЕС (<i>in vivo</i>)*	Анатоксиносвязывание на клетках CHO-K1* (<i>in vitro</i>)
1	4000	5333,3 \pm 666,6
2	4000	4666,6 \pm 666,6
3	6000	6000,0 \pm 0
4	6000	5333,3 \pm 666,6
5	6000	7333,3 \pm 666,6
6	8000	8666,6 \pm 666,6
7	4000	5333,3 \pm 666,6
8	8000	6666,6 \pm 666,6

Примечание:* реципрокный титр

Значения активности ХА в реакции анатоксиносвязывания, полученные при использовании клеточной линии CHO-K1, соответствовали образцы

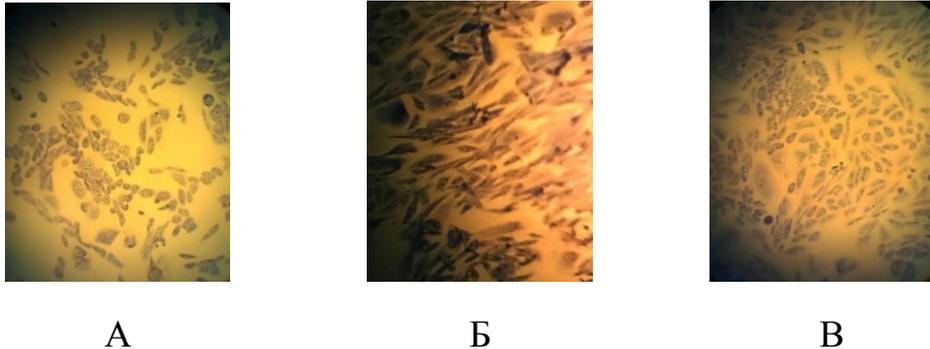
№ 2, 3, 4, 8), а в некоторых случаях оказались более высокими (образцы № 1, 5, 6, 7) по сравнению со значениями, полученными с использованием кроликов. В результате исследования показана высокая степень соответствия полученных данных, определена положительная корреляция с коэффициентом Пирсона 0,82.

Специфическая фракция ХА является пригодной для дальнейшего формирования таблеток вакцины холерной при наличии специфической активности от 2 000 ЕС в 1 мг фракции (по белку) при тестировании на кролике. Учитывая высокую степень соответствия полученных результатов между регламентным методом *in vivo* и экспериментальным методом *in vitro*, предлагается использовать то же значение показателя «специфическая активность» ХА – не менее 1:2000 ЕС в 1 мг по белку в реакции анатоксиносвязывания на клетках линии СНО-К1.

Следует отметить, что применение клеточной линии СНО-К1 наиболее перспективно для замены животных на промежуточных этапах контроля активных компонентов холерной химической вакцины. Использование клеточной линии Vero оказалось малоприспособленным для данного метода контроля, поскольку клетки этой линии показали меньшую чувствительность к ХТ.

На следующем этапе проводилась работа по оценке возможного использования перевиваемой клеточной линии СНО-К1 для оценки специфической безвредности ХА. Согласно ПР специфическая безвредность ХА оценивается на модели кроликов-сосунков: при внутрикишечном введении ХА в количестве 100000 ЕС должен отсутствовать «синдром холерогенности». Для исследования 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 CO₂-инкубатор при температуре (37,0±0,2) °С и 5 % CO₂. В качестве положительного контроля использовали СОП ХТ, в качестве отрицательного

контроля – интактные клетки СНО-К1. Обнаружено отсутствие повреждающего действия ХА в 6-7 лунках, соответствующего разведениям образцов 1:32-1:64 (рисунок 5). Концентрация ХА соответствовала содержанию 0,1 мг/мл. На рисунке 5 продемонстрировано воздействие ХА на клетки СНО-К1.



А – интактные клетки СНО-К1 (контроль отрицательный);

Б – воздействие СОП ХТ на клетки СНО-К1 (контроль положительный);

В – клетки СНО-К1 под воздействием ХА в концентрации 0,1 мг/мл

Рисунок 5 – Определение специфической безвредности ХА с использованием культуры клеток СНО-К1 ($\times 100$)

Определено пороговое значение концентрации ХА, при котором отсутствует повреждающее действие на клетки СНО-К1.

Таким образом, на данном этапе исследований экспериментально обоснована возможность использования перевиваемой клеточной линии СНО-К1 для контроля антигенов и установлены нормируемые значения следующих показателей в цикле производства холерной химической вакцины:

1) «специфическая активность» ХТ – реакторная культура штамма *V. cholerae* 569В пригодна для дальнейшего выделения специфических антигенов при наличии положительной цитотоксической реакции на клетках перевиваемой линии СНО-К1 в разведениях не менее 1:80.

2) «специфическая активность» компонента холерной химической вакцины – ХА в реакции анатоксиносвязывания на клетках перевиваемой клеточной линии СНО-К1 – значение показателя 1:2000 ЕС в 1 мг ХА.

3) «специфическая безвредность» компонента холерной химической вакцины – в концентрации 0,1 мг/мл ХА не должен оказывать специфического повреждающего действия на клетки СНО-К1.

3.3 Разработка алгоритма комплексного методического подхода *in vitro* для контроля специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина

Задачей исследований, результаты которых приведены в данном разделе, была разработка алгоритма и количественных критериев оценки применения методов *in vitro* для контроля активности антигенов на промежуточных этапах и в готовом препарате холерной химической вакцины.

Токсигенные свойства культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569В – продуцента ХТ изучают в соответствии с ПР на модели кроликов-сосунков. Применение сочетания методов ПЦР и РПИГ позволяет подтвердить токсигенность штамма методами *in vitro* и на данном этапе производства вакцины отказаться от использования животных. Установлен критерий применимости методов: содержание ХТ в РПИГ, GM₁ ELISA, ДИА ЗНЧ не менее 1:8, на модели линии клеток СНО-К1 – не менее 1:80.

ХА в лиофилизированной форме тестируют по специфической активности ХТ в реакции анатоксиносвязывания на кроликах. Специфическая активность методом анатоксиносвязывания на клетках СНО-К1 должна быть не менее 2000 ЕС в 1 мг ХА. Активность ХА в ДИА ЗНЧ должна быть не ниже 1:8.

Активность ХА в составе готовой лекарственной форме тестируется методом анатоксиносвязывания. Активность ХА в ДИА ЗНЧ должна быть не ниже 1:512.

В таблице 11 представлены методы *in vitro*, перспективные в качестве методов контроля представленных выше показателей качества холерной химиче. Применение комплекса методов *in vitro* ПЦР, РПИГ, ДИА ЗНЧ, GM₁ ELISA и с использованием перевиваемой клеточной линии СНО-К1 позволяет одновременно определить иммунохимическую и биологическую активность антигенов в компонентах и готовой лекарственной форме вакцины. Для внедрения данных методов необходима дальнейшая работа по валидации значений контролируемых параметров. Замена в производстве холерной химической вакцины методов, связанных с использованием животных, таких как кожная проба по Крейгу, реакция анатоксиносвязывания, определение токсигенности штаммов на кроликах-сосунках, на *in vitro* (тесты на культуре клеток СНО-К1, молекулярно-генетические, иммунохимические) является перспективным направлением стандартизации методов контроля иммунобиологических лекарственных препаратов. Алгоритм применения комплекса *in vitro* и *in vivo* для контроля специфической активности антигенов в компонентах и готовой лекарственной форме на этапах производства холерной химической вакцины представлен на рисунке 6.

Таблица 11 – Методы *in vitro* для контроля специфической активности антигенов в компонентах и готовой лекарственной форме.

Объект контроля	Контролируемый параметр	Регламентный метод	Значение	Предлагаемый метод	Значение
Реакторная культура штамма <i>V. cholerae</i> 569В	Токсигенность	Холерогенность	Наличие выраженного «синдрома холерогенности»	ПЦР (ГенХол)	Наличие гена <i>ctxA</i>
	Специфическая активность ХТ	Кожная проба по Крейгу	Должен быть специфически активным не менее 1:2000	ДИА ЗНЧ	Не менее 1:8
				Активность на клетках CHO-K1	Не менее 1:80
				РПИГ	Не менее 1:8
GM ₁ ELISA	Не менее 1:8				
Холероген-анатоксин лиофилизированный	Специфическая безвредность	Остаточная холерогенность	Отсутствие «синдрома холерогенности» в 100000 ЕС	Активность на клетках CHO-K1	Отсутствие повреждающего действия 0,1 мг/мл ХА
	Специфическая активность	Реакция анатоксиносвязывания	В 1 мг 2 000 – 12 000 ЕС	Анатоксиносвязывание на клетках CHO-K1	В 1 мг ХА не менее 2 000 ЕС
				ДИА ЗНЧ	Не менее 1:8
Вакцина холерная бивалентная химическая	Специфическая безопасность	Кожная проба	В разведении не более 1:6000 (60000 ЕС/мл) не образуются папулы	GM ₁ ELISA	Отсутствие специфического окрашивания
	Специфическая активность	Реакция анатоксиносвязывания	Одна таблетка должна содержать 100000 ± 20000 ЕС холерогена-анатоксина	ДИА ЗНЧ	Не менее 1:512

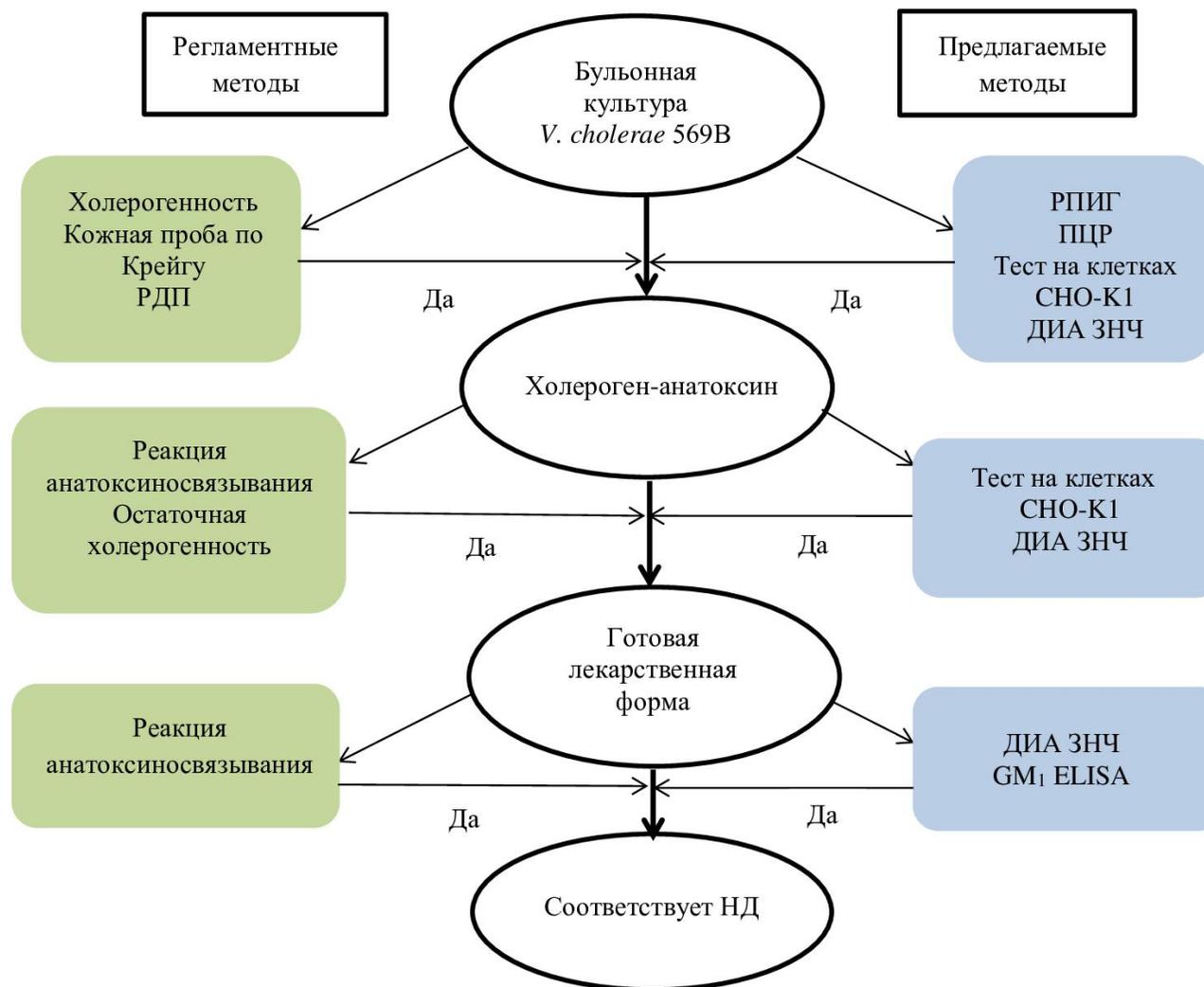


Рисунок 6 – Алгоритм использования методов *in vitro* и *in vivo* для контроля специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина на этапах производства холерной химической вакцины (голубым цветом отмечены методы *in vitro*, зеленым – *in vivo*)

ГЛАВА 4 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИЧЕСКОГО ПОДХОДА К КОНТРОЛЮ СТАБИЛЬНОСТИ СВОЙСТВ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* – ПРОДУЦЕНТОВ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ВАКЦИНЫ

Задачей данного этапа исследований являлось проведение комплексного анализа стабильности штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 в процессе производственного цикла.

4.1 Изучение стабильности свойств штаммов *Vibrio cholerae* 569В и *Vibrio cholerae* М-41 в условиях производственного цикла

В соответствии с ПР в начале производственного цикла морфологию штаммов-продуцентов *V. cholerae* проверяют путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму; культуральные свойства изучают в посевах на жидкие и твердые питательные среды; подвижность определяют при посеве культуры петлей на агаре уколом; биохимические свойства проверяют путем посева на среды Гисса с 0,1% углеводами; серологические свойства контролируют в реакции агглютинации. Для подтверждения на присутствие в хромосоме токсичного гена *ctxA* у штамма *V. cholerae* 569В изучают методом ПЦР.

С применением нового методического подхода, описанного в главе 3 и с помощью АСМ и ТЭМ изучалась стабильность свойств штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 в условиях производственного цикла по следующим показателям: морфология, активность антигенов, вирулентность и токсигенность холерного вибриона на всех этапах культивирования.

Для исследования брали образцы субкультур производственных штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* 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.

На всех этапах контролировали чистоту посевов на отсутствие посторонней микрофлоры и концентрацию посевной микробной массы.

Исследована возможность оценки активности ХТ и О-Аг с первых часов глубинного культивирования штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 с применением экспресс-метода ДИА ЗНЧ. Для этого в работу были взяты образцы с первого по десятый часы культивирования с момента посева культуры в биореактор (рисунок 7).



К+ – положительный контроль (для штамма *V. cholerae* 569В – СОП ХТ; для штамма *V. cholerae* М-41 – лиофилизированный О-Аг Огава);

К- – отрицательный контроль (раствор 0,9 % NaCl);

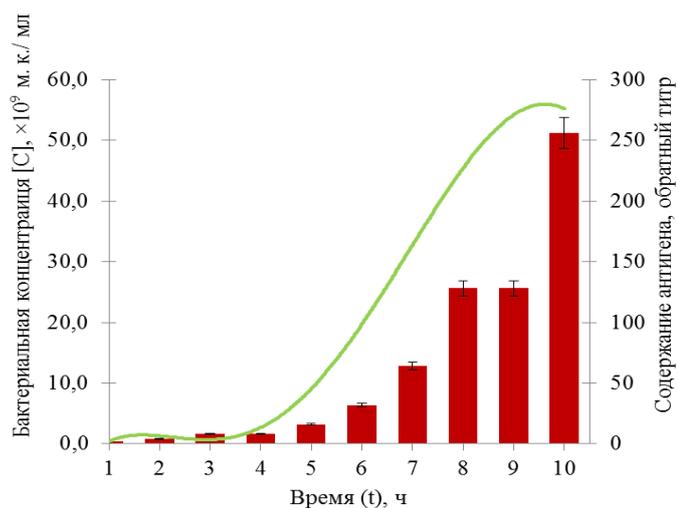
1-10 – время культивирования, ч

Рисунок 7 – Определение специфической активности ХТ и О-Аг методом ДИА ЗНЧ в образцах реакторной культуры штаммов *V. cholerae* при глубинном культивировании (двукратные разведения с 1:2)

Наличие антигенов при глубинном культивировании детектировали, начиная с ранней экспоненциальной фазы роста с первого часа для О-Аг и с третьего часа для ХТ. Максимальная продукция антигенов наблюдалась в стационарной фазе роста (9-10 ч от начала выращивания) у штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В (титр более 1:128) (рисунки 8 и 9). В ста-

ционарной фазе роста титр ХТ составил 1:64 (в соответствии с ПР титр не менее 1:1 в РДП), а О-Аг – 1:128 (в соответствии с ПР титр не менее 1:4 в РДП).

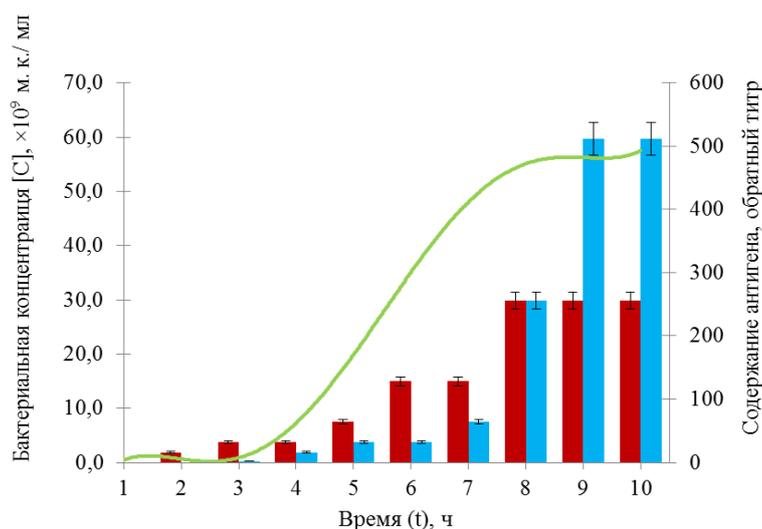
Синтез ХТ и О-Аг штаммами *V. cholerae* подтверждали по показателю «специфическая активность» иммунохимическим методом (ДИА ЗНЧ).



■ Концентрация О-Аг

— Концентрация микробных клеток ×10⁹ м.к./мл

Рисунок 8 – Динамика роста и продукции антигена при глубинном культивировании производственного штамма *V. cholerae* М-41 на казеиновом бульоне на основе жидкого гидролизата казеина



- Концентрация О-Аг
- Концентрация ХТ
- Концентрация микробных клеток ×10⁹ м.к./мл

Рисунок 9 – Динамика роста и продукции антигенов при глубинном культивировании производственного штамма *V. cholerae* 569В на казеиновом бульоне на основе жидкого гидролизата казеина

Далее было выявление фрагмента ДНК размером 564 н.п., соответствующего нуклеотидной последовательности *ctxA* гена, производственных штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 с использованием тест-системы ГенХол методом полимеразной цепной реакции в 20 образцах реакторной культуры с первого по десятый часы культивирования.

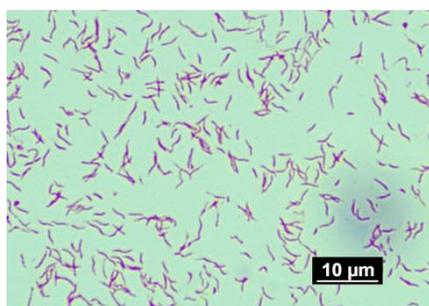
Во всех 20 образцах реакторной культуры штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 были выявлены фрагменты ДНК размером 564 н.п., соответствующие нуклеотидной последовательности *ctxA* гена, кодирующего А-субъединицу холерного токсина. Это свидетельствует о содержании полноценного гена *ctxA* при глубинном культивировании штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41. Параллельно подтверждали токсигенность штамма *V. cholerae* 569В методом РПИГ в образцах реакторной культуры в стационарной фазе роста, титр составил (213,3±42,6) (рисунок 10).



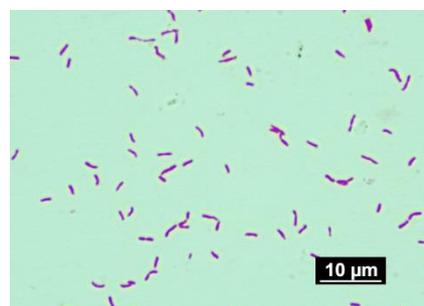
K+ – положительный контроль, K- – отрицательный контроль,
1-10 – время культивирования, ч (с первого по десятый часы)

Рисунок 10 – Выявление фрагмента ДНК размером полосы 564 н.п. у штаммов *V. cholerae* 569В (А) и *V. cholerae* М-41 (Б) с использованием тест-системы ГенХол методом полимеразной цепной реакции

Методом световой микроскопии при окрашивании по Граму была отмечена типичность формы бактерий во всех исследованных образцах (рисунок 11). На рисунке 11 продемонстрированы клетки штаммов *V. cholerae* в стационарной фазе роста.



V. cholerae 569В

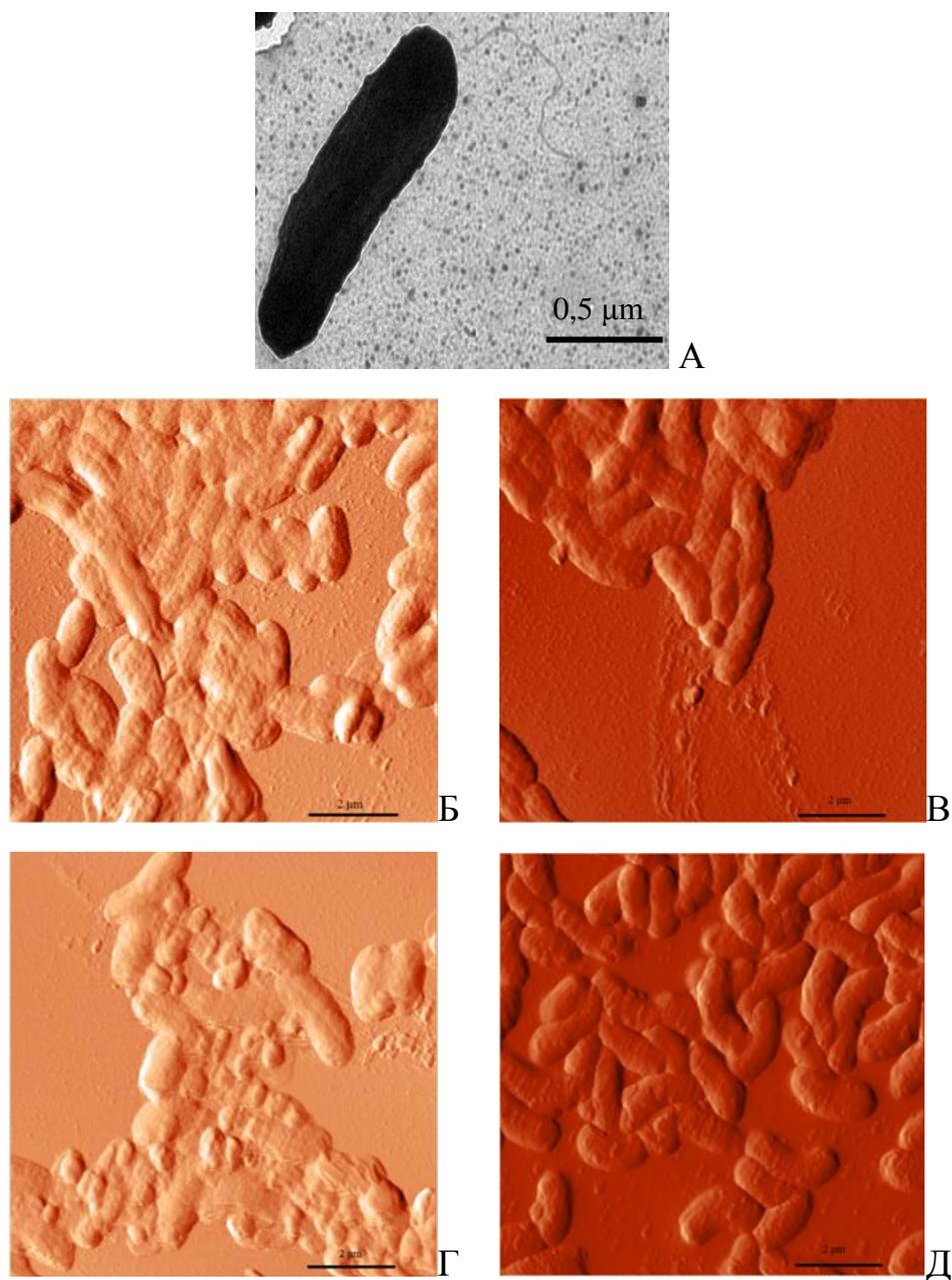


V. cholerae М-41

Рисунок 11 – Окраска мазков по Граму клеток штаммов *V. cholerae* при глубинном культивировании в стационарной фазе роста (10 ч)

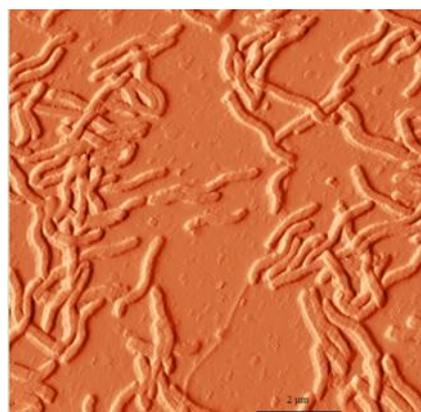
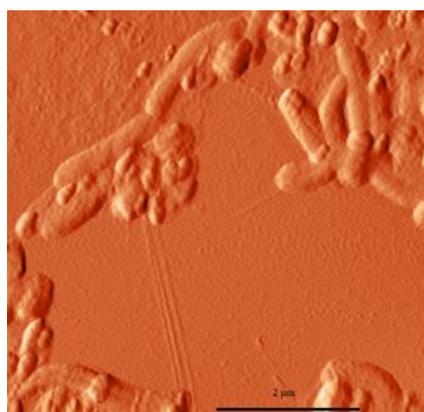
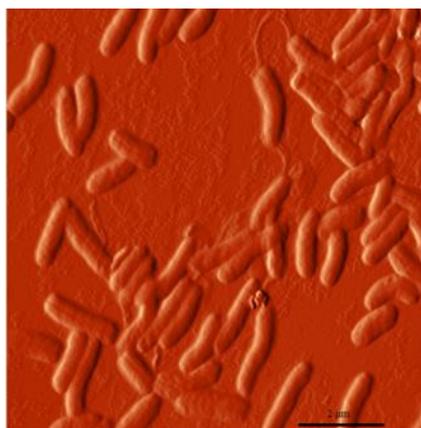
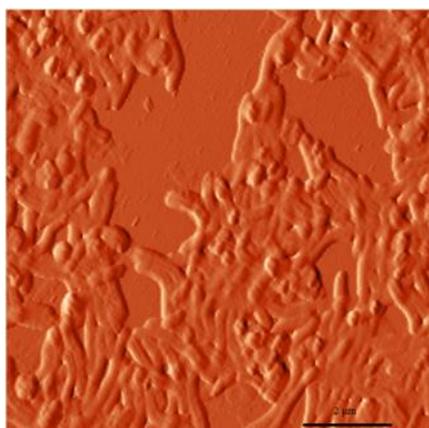
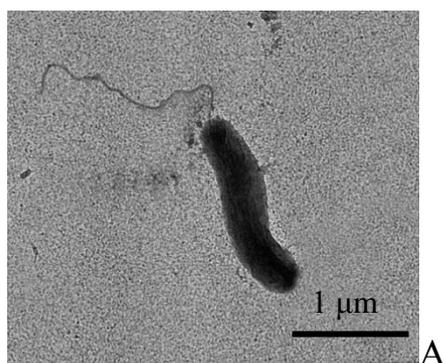
Методом ТЭМ на всех этапах четко визуализировались типичные вибрионы. В условиях глубинного культивирования в биореакторе и наличии оптимальных условий в среде выращивания (температура, рН, подкормка раствором глюкозы) к 10 ч культивирования у клеток четко просматривался жгутик, независимо от штамма. Методом АСМ были изучены морфометрические показатели микробных клеток штаммов *V. cholerae* в процессе подго-

товки посевного материала (I – III пассажей) и культивирования в биореакторе при стационарной фазе роста (рисунок 12 и 13; таблица 12).



А – трансмиссионная электронная микроскопия;
Атомно-силовая микроскопия (методами рассогласования и
отображения фазы): Б – I пассаж; В – II пассаж;

Г – III пассаж; Д – реакторная культура в стационарной фазе роста
Рисунок 12 – Электронные микрофотографии клеток при глубинном
культивировании штамма *V. cholerae* M-41



А – трансмиссионная электронная микроскопия;
 Атомно-силовая микроскопия (методами рассогласования и
 отображения фазы): Б – I пассаж; В – II пассаж;
 Г – III пассаж; Д – реакторная культура в стационарной фазе роста
 Рисунок 13 – Электронные микрофотографии клеток при глубинном
 культивировании штамма *V. cholerae* 569В

На рисунках 12А и 13А продемонстрированы электронные микрофотографии клеток штаммов *V. cholerae* в стационарной фазе роста.

Таблица 12 – Морфометрические показатели клеток холерного вибриона штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 по результатам АСМ (n=3)

Штамм <i>V.cholerae</i>	Этапы культивирования	Длина, мкм	Ширина, мкм	Высота, мкм	Шероховатость, нм R_q
569В	I пассаж	2,4±0,2	0,59±0,05	0,26±0,02	24±1
	II пассаж	3,11±0,1	0,81±0,08	0,25±0,02	25±1
	III пассаж	2,3±0,1	0,8±0,07	0,24±0,02	23±1
	стационарная фаза	3,51±0,2	0,52±0,02	0,15±0,02	20±1
М-41	I пассаж	1,7±0,1	0,62±0,03	0,24±0,02	22±1
	II пассаж	2,3±0,15	0,56±0,03	0,29±0,03	21±1
	III пассаж	2,3±0,1	0,67±0,02	0,28±0,02	19±1
	стационарная фаза	1,9±0,1	0,71±0,05	0,26±0,03	17±1

Морфометрические показатели микробных клеток штамма *V. cholerae* М-41 остаются практически неизменными в течение I-III пассажей: длина (2,05±0,1) мкм, ширина (0,64±0,05) мкм, высота (0,26±0,03) мкм. В условиях глубинного культивирования параметры клетки *V. cholerae* М-41 не изменились. У штамма *V. cholerae* 569В в процессе глубинного культивирования в стационарной фазе клетки изменили свои линейные размеры в сторону увеличения длины в среднем с (2,4±0,1) мкм до (3,51±0,2) мкм. При этом высота (0,255±0,02) мкм и ширина (0,7±0,03) мкм в среднем не изменились. Шероховатость клеточной стенки у обоих штаммов снижалась, что может быть связано с увеличением выхода секретируемых клетками антигенов. Полученные данные ТЭМ и АСМ свидетельствуют о стабильности штаммов по морфометрическим параметрам.

На данный момент современные технологии открывают новые возможности исследований молекулярно-генетической структуры штаммов *V. cholerae*. С помощью молекулярно-генетических методов можно выявить

появление мутаций и оценить стабильность геномов производственных штаммов. Методом полногеномного секвенирования была исследована структура ДНК производственных штаммов холерного вибриона на этапах культивирования. В таблице 13 приведены названия профагов, остров патогенности, генов и локусов, идентичность нуклеотидной последовательности которых на этапах производственного цикла культивирования штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В проверялась в первую очередь.

Сравнительный анализ собранных нуклеотидных последовательностей полного генома штамма *V. cholerae* М-41, полученных для клеток, отобранных из пассажей I, II, III и в стационарной фазе роста, показал полную идентичность этих секвенированных геномов. Аналогично сравнение секвенированных образцов штамма *V. cholerae* 569В, полученных для клеток, отобранных из пассажей I, II, III пассажах и в стационарной фазе роста, показало полную идентичность этих геномов.

Таблица 13 – Сравнительная характеристика данных полногеномного секвенирования штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41

Штаммы <i>V. cholerae</i>	Этапы культиви- рования	Профаг		Остров патогенности		Гены			
		CTXφ (<i>ctxA</i> , <i>ctxB1</i>)	RSI (<i>rstR</i> classical)	VPI-I	VPI-II	ToxT	ToxR	ToxS	локус O1 (wbe)*
569В	I пассаж	+	+	+	+	+	+	-	+
	II пассаж	+	+	+	+	+	+	-	+
	III пассаж	+	+	+	+	+	+	-	+
	Стацио- нарная фаза	+	+	+	+	+	+	-	+
М-41	I пассаж	+	+	+	+	+	+	+	+
	II пассаж	+	+	+	+	+	+	+	+
	III пассаж	+	+	+	+	+	+	+	+
	Стацио- нарная фаза	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: * Локус, содержащий гены необходимые для биосинтеза антигена O1, расположенные между фланкирующими генами *gmhD* и *rjg* [Seed K.D. *et al.*, 2012]

Полученные данные полногеномного секвенирования подтверждают высокую стабильность геномов производственных штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В – продуцентов специфических антигенов, входящих в состав холерной химической вакцины.

Таким образом, с использованием комплекса методов *in vitro* был 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 иммунобиологического лекарственного препарата «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой», которые депонированы в ГКПБ ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора: *V. cholerae* О1 классического биовара серовара Инаба КМ2129 (569В) и *V. cholerae* О1 классического биовара серовара Огава КМ2130 (М-41).

4.2 Экспериментальное обоснование применения питательной среды на основе сухого ферментативного гидролизата казеина для глубинного культивирования штаммов *Vibrio cholerae* 569В и *Vibrio cholerae* М-41

Состав питательной среды играет важную роль в процессе получения антигенных компонентов вакцины, обеспечивающих ее протективные свойства. В настоящее время в процессе глубинного культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов компонентов холерной вакцины используется питательная среда – казеиновый бульон (рН 8,0±0,2), содержащий аминный азот (200±0,1) мг% и до 1% пептон, на основе панкреатического гидролизата казеина – жидкого основного раствора казеина (ОРК), пригото-

ленного лабораторным способом. В производстве холерной химической вакцины нормируемыми показателями глубинного культивирования является количество м.к. в стационарной фазе роста – $(50 \pm 15) \times 10^9$ м.к./мл) и специфическая активность антигенов (ХТ, О-Аг). В то же время важным показателем является масса лиофилизированных антигенных компонентов вакцины (ХА, О-Аг), полученных из культуральной жидкости каждого реактора.

Был проведен ретроспективный анализ эффективности культивирования производственных штаммов на казеиновом бульоне на основе жидкого гидролизата казеина (ОРК) по следующим показателям: концентрация биомассы и количество сухого специфического антигена. Глубина выборки составила 5 лет, для анализа использовалась информация протоколов культивирования и контроля свойств специфических антигенных компонентов вакцины. Все серии ОРК соответствовали требованиям МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [МУК 4.2.2316-08, 2008] и МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» [МУ 3.3.2.2124-06, 2006].

В таблице 14 представлены результаты ретроспективного анализа эффективности масштабного культивирования производственных штаммов *V.cholerae* М-41 и *V.cholerae* 569В на казеиновом бульоне из жидкого гидролизата казеина за период 2013-2017 гг.

Таблица 14 – Ретроспективный анализ эффективности казеинового бульона на основе жидкого гидролизата казеина при масштабном культивировании производственных штаммов *V.cholerae* М-41 и *V.cholerae* 569В

<i>V.cholerae</i> М-41						
Год	Серия ОРК №	n	Концентрация биомассы $(M \pm m) \times 10^9$ м.к.мл ⁻¹	Вариабельность, %	Кол-во антигена (О-Аг, г) $(M \pm m)$, г	Вариабельность, %
2013	55	4	68,4±5,4	7,9	149,0±36,0	24,1
2015	56	2	48,4±0,0	18,2	120,0±0,0	0,0

2015-2016	57	15	46,5±7,1	15,2	128,0±28,4	22,1
2016-2017	58	8	52,7±4,0	7,6	274,5±188,5	68,6
<i>V.cholerae</i> 569В						
Год	Серия ОРК №	n	Концентрация биомассы (M±m) × 10 ⁹ м.к.мл ⁻¹	Вариабельность, %	Кол-во антигена (ХА) (M±m), г	Вариабельность, %
2013-2014	55	25	65,7±5,6	8,5	132,1±59,3	44,8
2014-2015	56	18	59,6±8,6	14,4	251,3±86,2	34,3
2015-2016	57	14	46,7±4,8	10,2	98,9±16,2	16,4
2016-2017	58	24	50,2±8,3	16,5	128,3±35,9	28,0

Для штамма *V.cholerae* М-41 были отмечены следующие показатели эффективности питательной среды на основе ОРК: по концентрации биомассы $(56,6 \pm 1,1) \times 10^9$ м.к. мл⁻¹, по выходу антигена (О-Аг) – $(183,7 \pm 60,2)$ г, максимальное значение вариабельности показателей было в пределах от 7,6 % до 18,2 % и от 22,1 % до 68,6 %, соответственно.

Для штамма *V.cholerae* 569В зарегистрированы следующие показатели эффективности питательной среды на основе ОРК: по концентрации биомассы – $(55,6 \pm 7,1) \times 10^9$ м.к. мл⁻¹, по выходу антигена (ХА) – $(152,7 \pm 49,4)$ г, максимальное значение вариабельности показателей было в пределах от 8,5 % до 16,5 % и от 16,4 % до 44,8 %, соответственно.

В результате ретроспективного анализа эффективности питательных сред на основе ОРК было выявлено, что по показателю концентрации биомассы все серии казеинового бульона соответствовали требованиям ПР. По выходу специфических антигенов была выявлена большая вариабельность в пределах одной серии ОРК (до 68 %) и между сериями (более 30 %).

Для стандартизации процесса глубинного культивирования производственных штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В была проведена рабо-

та по экспериментальному обоснованию возможности применения питательной среды на основе сухого ферментативного гидролизата казеина (ФГК).

На первом этапе в условиях малообъемного культивирования было экспериментально подобрано содержание аминного азота в среде на основе ферментативного гидролизата казеина (ФГК) в диапазоне от 60 до 200 мг%. Было проведено 3 цикла культивирования для каждого штамма *V. cholerae*. Оптимальная концентрация биомассы обоих штаммов и содержание антигенов (ХТ и О-Аг) отмечалось при использовании среды с содержанием аминного азота 100 мг%, 150 мг% и 200 мг%.

Далее было проведено экспериментально-производственное выращивание штаммов *V. cholerae* в биореакторах на питательных бульонах из ОРК и ФГК. Культивирование производственных штаммов *V. cholerae* на всех анализируемых питательных средах осуществляли в условиях, соответствующих требованиям ПР.

Для сравнения результатов, полученных при выращивании штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В на питательных средах с разной основой и отличающихся содержанием аминного азота, начиная с пятого часа роста, производили отбор образцов реакторной культуры, в которых определяли концентрацию м.к. и содержание антигенов. Кроме того, для штамма *V. cholerae* 569В контролировали активность ХТ в образцах реакторной культуры постановкой РПИГ.

Было проведено 3 цикла культивирования каждого штамма на указанных выше питательных средах. Анализ полученных результатов показал, что конечная концентрация м.к. в бульонных культурах была не менее $(35,0 \pm 0,5)$ млрд/мл м.к. и соответствовала требованиям ПР. При культивировании штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В данный показатель был выше при использовании среды на основе ФГК с содержанием аминного азота 150 мг%. 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.

Далее была изучена специфическая активность антигенов в бульонных культурах в стационарной фазе роста (таблица 15). Как видно из таблицы 15, наибольшие показатели активности отмечались при использовании среды на основе ФГК с содержанием аминного азота 150 мг%.

Таблица 15 – Сравнительная характеристика эффективности питательных сред на основе гидролизатов казеина при глубинном культивировании производственных штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В (n=3)

Среда культивирования на основе гидролизата казеина		Активность О-Аг		Активность ХТ <i>V. cholerae</i> 569В	
		<i>V. cholerae</i> М-41	<i>V. cholerae</i> 569В		
		ДИА ЗНЧ*	ДИА ЗНЧ*	РПИГ*	ДИА ЗНЧ*
ФГК аминный азот мг%	100	213,3±42,6	170,6±42,6	96,0±32,0	106,6±21,3
	150	853,3±170,6	682,6±170,6	138,6±64,8	682,6±170,6
	200	853,3±170,6	426,6±85,3	138,6±64,8	682,6±170,6
ОРК		213,3±42,6	170,6±42,6	90,6±37,3	384,0±128,0

Примечание: * реципрокный титр

По результатам ДИА ЗНЧ титр специфической активности О-Аг составил (853,3±170,6) для *V. cholerae* М-41 и (682,6±170,6) для *V. cholerae* 569В, активность ХТ – (682,6±170,6). Данные показатели превышали аналогичные характеристики, полученные при использовании среды на основе ОРК. В частности, реципрокный титр активности О-Аг штамма *V. cholerae* М-41 составил (213,3±42,6), штамма *V. cholerae* 569В – (170,6±42,6), ХТ (384,0±128,0). Активность ХТ в образцах реакторной культуры *V. cholerae* 569В в РПИГ составила (138,6±64,8) при культивировании на среде из ФГК и (90,6±37,3) на среде на основе ОРК.

Таким образом, сравнивая эффективность питательных сред на основе ФГК и ОРК при глубинном культивировании производственных штаммов в условиях биореактора, можно сделать вывод об эффективности использования среды на основе ФГК с содержанием аминного азота 150 мг% в производстве холерной химической вакцины.

Далее были проанализированы динамика роста и продукция антигенов при глубинном культивировании производственных штаммов на казеиновом бульоне на основе ФГК с содержанием аминного азота 150 мг% (рисунок 14 и 15).

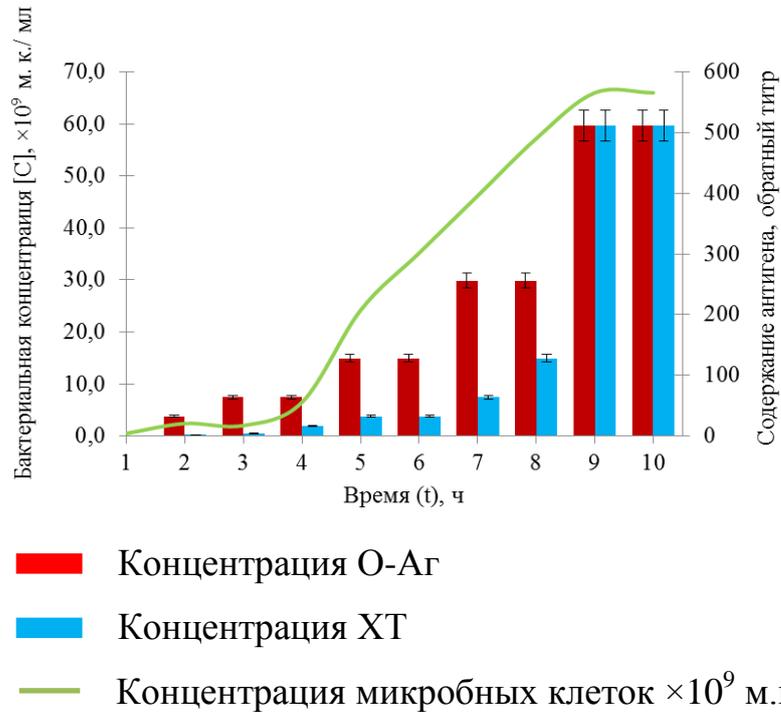
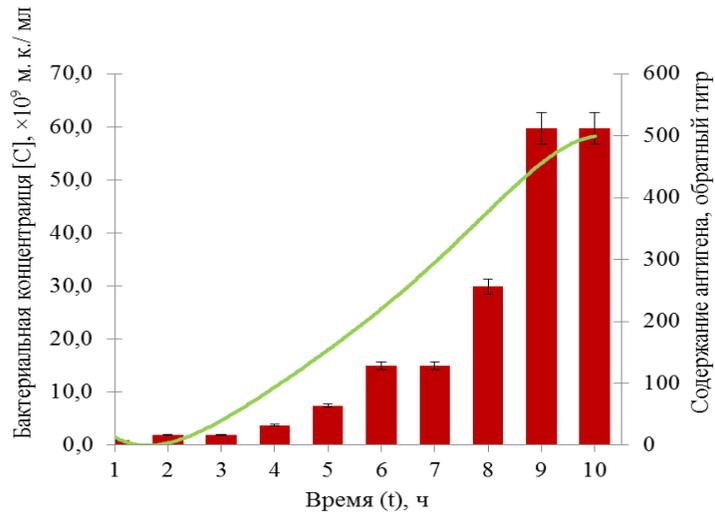


Рисунок 14 – Динамика роста и продукции антигенов при глубинном культивировании производственного штамма *V. cholerae* 569В на казеиновом бульоне на основе сухого ферментативного гидролизата казеина



■ Концентрация О-Аг

— Концентрация микробных клеток ×10⁹ м.к./мл

Рисунок 15 – Динамика роста и продукции антигена при глубинном культивировании производственного штамма *V. cholerae* M-41 на казеиновом бульоне на основе сухого ферментативного гидролизата казеина

Также был проведен анализ токсигенных свойств производственных штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* M-41 методом ПЦР с первого по десятый часы культивирования в образцах реакторных культур (20 образцов) (рисунок 16).

Во всех образцах штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* M-41 были выявлены фрагменты ДНК размером 564 н.п., соответствующие нуклеотидной последовательности *ctxA* гена, кодирующего А-субъединицу холерного токсина. Это свидетельствует о содержании полноценного гена *ctxA* в штаммах *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* M-41 при глубинном культивировании.



К+ – положительный контроль (564 н.п.), К- – отрицательный контроль,
1-10 – время культивирования, ч (с первого по десятый часы)

Рисунок 16 – Выявление фрагмента ДНК размером 564 н.п. у штаммов *V. cholerae* 569В (А) и *V. cholerae* М-41 (Б) с использованием тест-системы ГенХол методом полимеразной цепной реакции

В каждой пробе был выявлен фрагмент ДНК, свидетельствующий о наличии полноценного *stxA*-гена (полоса 564 н.п.).

Следующим этапом исследования был анализ соотношения массы лиофилизированных антигенных компонентов, полученных при культивировании штаммов-продуцентов на казеиновом бульоне на основе ОРК и ФГК. В результате, масса лиофилизованного О-Аг, полученного при культивировании на среде на основе ФГК, в 1,5 раза превысила массу аналогичной фракции, полученной при культивировании на среде на основе ОРК: (651,6±103,4) г и (446,3±30,7) г, соответственно. Для ХА этот показатель составил (387,3±78,8) г при культивировании на среде на основе ФГК и (267,6±37,4) г при культивировании на среде на основе ОРК (таблица 16).

Таблица 16 – Сравнительный анализ выхода компонентов вакцины и активности антигенов в РНГА и реакции анатоксиносвязывания при культивировании производственных штаммов *V. cholerae* 569В (ХА) и М-41 (О-Аг) (n=3)

Среда культивирования						
ОРК				ФГК		
Штамм <i>V. cholerae</i>	Масса, г	РНГА* (О-Аг)	анатоксино- связывание* (ХА)	Масса, г	РНГА* (О-Аг)	анатокси- носвязы- вание* (ХА)
569В	267,6± 37,4	-	7333,3± 666,6	387,3± 78,8	-	10666,6± 666,6
М-41	446,3± 30,7	3299,3± 796,2	-	651,6± 103,4	5458,6± 681,3	-

Примечание: * реципрокный титр

Сравнительный анализ показателей количества и активности протективных антигенов, полученных из штаммов *V. cholerae*, выращенных методом глубинного культивирования на питательных средах на основе ФГК показал, что среда соответствует требованиям ПР (концентрация м.к., активность антигенов по нормируемым показателям) и может использоваться в производстве холерной химической вакцины. Выход антигенов, выделенных из культуральной жидкости штаммов-продуцентов, выращенных на казеиновом бульоне на основе ФГК, был в 1,5 раза выше, чем при использовании сред на основе ОРК.

По результатам исследования питательная среда на основе ФГК внедрена в производство вакцины холерной химической (внесение изменений в ПР № 01898109-65-22/1000, № 01898109-65-22/10000). Был проведен ретроспективный анализ эффективности казеинового бульона на основе жидкого и сухого гидролизатов казеина для масштабного культивирования производственных штаммов *V. cholerae*.

Для анализа использовалась информация протоколов культивирования и контроля свойств специфических компонентов, используемых в производстве холерной химической вакцины. Ретроспективный анализ был проведен

за 5 лет (2013-2017 гг) для ХА и за 4 года (2013, 2015-2017 гг) для О-Аг, а оперативный анализ – за 6 лет (для ХА и О-Аг – 2017, 2019-2023 гг). При сравнении основ питательных сред для культивирования производственных штаммов *V. cholerae* было установлено, что их тип (жидкая и сухая) оказывает влияние на конечный выход целевого продукта. Тогда как по приросту биомассы не имели статистической разницы (требование ПР: концентрация биомассы должна составлять $(50 \pm 15) \times 10^9$ м.к./мл). Результаты применения сред с различной основой при глубинном культивировании *V. cholerae* М-41 представлены на рисунке 17.

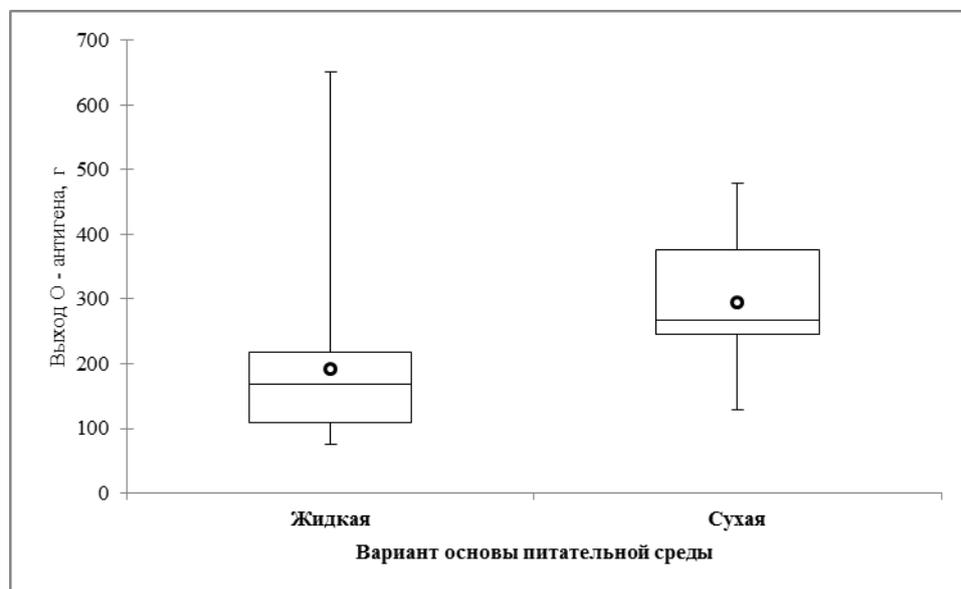


Рисунок 17 – Распределение данных по выходу О-Аг при культивировании *V. cholerae* М-41 на питательных средах на основе жидкого и сухого гидролизатов казеина

При $p < 0,05$ значение критерия Стьюдента составило 6,21 при критическом 1,99, что указывало на статистически значимую разницу выхода О-Аг в зависимости от варианта основы питательной среды. Для питательной среды с жидкой основой выход продукта составил $(191,3 \pm 16,2)$ г, для питательной среды с сухой основой $(294,4 \pm 17,9)$ г. Применение сред на основе сухого гидролизата казеина приводило к более стандартным результатам по

показателю выхода целевого продукта, коэффициент вариации составил 63,8 % для сред с жидкой основой и 31,5 % для сред с сухой основой.

Результаты применения сред с различной основой при глубинном культивировании *V. cholerae* 569В представлены на рисунке 18.

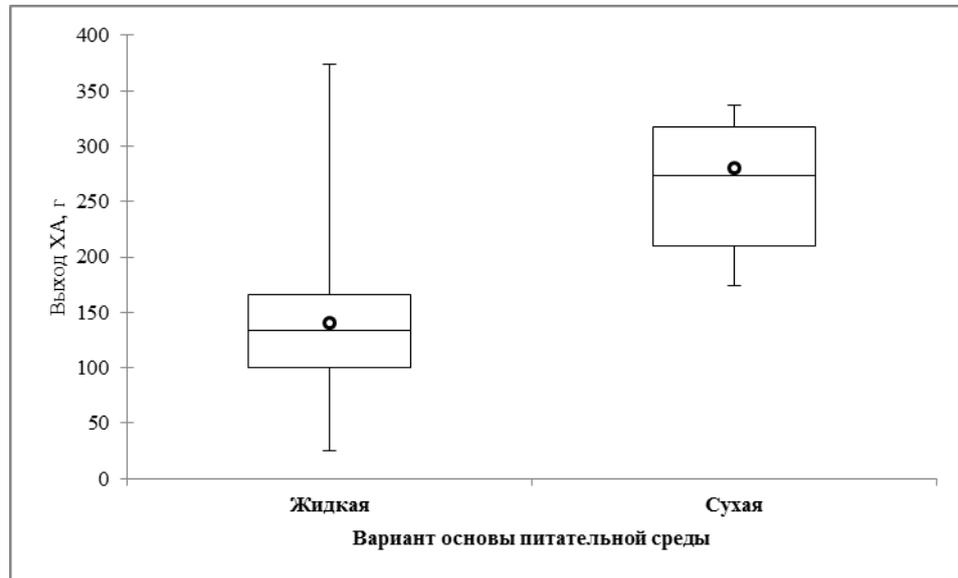


Рисунок 18 – Распределение данных по выходу ХА при культивировании *V. cholerae* 569В на питательных средах на основе жидкого и сухого гидролизатов казеина

При $p < 0,05$ значение критерия Стьюдента составило 9,6 при критическом 2,02, что указывает на статистически значимую разницу выхода ХА в зависимости от варианта основы питательной среды. Для питательной среды с жидкой основой выход продукта составил $(140,6 \pm 4,6)$ г, для питательной среды с сухой основой $(279,9 \pm 14,0)$ г. Коэффициент вариации по выходу ХА составил 45,6 % для сред с жидкой основой и 29,1 % для сред с сухой основой.

В результате ретроспективного и оперативного анализа эффективности питательных сред на основе жидкого и сухого гидролиза казеина было выявлено, что по показателю роста биомассы основы практически не отличались. По показателю «выход специфических антигенов» сухая основа была в 1,5 раза эффективнее, чем жидкая.

Согласно изложенным результатам с применением современных методов (атомно-силовой и трансмиссионной электронной микроскопии, полногеномного секвенирования, ДИА ЗНЧ, РПИГ) на всех этапах культивирования получены новые информативные характеристики и подтверждена стабильность штаммов по следующим показателям: культурально-морфологическим, иммунохимическим, генетическим.

Экспериментально обоснована эффективность применения питательной среды на основе сухого гидролизата казеина для реакторного культивирования производственных штаммов. Переход на использование сухих компонентов питательных сред позволяет сократить временные затраты на их приготовление и стандартизировать этап культивирования штаммов *V. cholerae* с увеличением в 1,5 раза выхода целевого продукта.

ГЛАВА 5 ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

Актуальность исследований в направлении оптимизации условий получения тест-токсина холерного обусловлена большой потребностью в данном стандартном образце для контроля антигенов на этапах производства холерной химической вакцины.

Для получения СОП ХТ используют производственный штамм *V. cholerae* 569В серовара Инаба. В настоящее время имеются как природные геноварианты *V. cholerae* биовара Эль Тор с повышенной продукцией ХТ, так и рекомбинантные штаммы-продуценты.

5.1 Выделение холерного токсина с использованием технологии ультрафильтрации

Токсин холерный очищенный, полученный по методу J.J. Mekalanos из бульонной культуры штамма *V. cholerae* 569В обладает высокой антигенной и протективной активностью и представляет собой белок с молекулярной массой 85 кДа, состоящий одной А субъединицы (27,2 кДа), и пяти В субъединиц (11,6 кДа) [Mekalanos J.J. *et al.*, 1978; Zhang R. *et al.*, 1995]. Традиционный метод, используемый для выделения ХТ, является многоэтапным процессом, время выделения (47±5) ч.

В настоящее время для очистки и концентрирования антигенов применяются методы ультрафильтрации [Громова О.В. и др., 2011; Комиссаров А.В. и др., 2015]. Широкое применение полимерных мембран обусловлено такими их достоинствами, как химическая и биологическая инертность, большой диапазон размеров пор, простота получения и относительная дешевизна.

Глубинное культивирование штамма *V. cholerae* 569В проводили в лабораторном биореакторе с рабочим объемом 1 л на основе ФГФ рН (8,0±0,1) с использованием 40 % глюкозы в качестве подкормки при температуре

($32,0 \pm 0,2$) °C в течение (10 ± 1) ч до достижения стационарной фазы роста микробной популяции. Далее процесс выделения ХТ складывался из ряда последовательно выполняющихся операций. Определение показателей активности ХТ проводили как традиционными тестами, так и с использованием разработанных методических подходов.

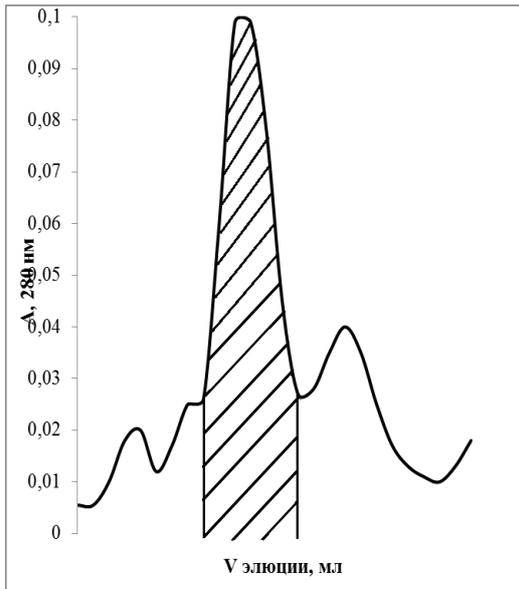
На первом этапе проводили стерилизующую фильтрацию культуральной жидкости 10 ч бульонной культуры *V. cholerae* 569В (1,0 л, активность ХТ составила 1:32 в РДП (в ДИА ЗНЧ – 1:512), содержание в РДП О-Аг – 1:32) на мембранах с размером пор 0,22 мкм. Отделение О-Аг осуществляли методом тангенциальной ультрафильтрации с использованием мембран с номинальной отсечкой по молекулярной массе (НОММ) 100 кДа [Комиссаров А.В. и др., 2015] с последующим 10-кратным концентрированием культуральной жидкости методом тангенциальной ультрафильтрации 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. Инкубировали при температуре ($20,0 \pm 2,0$) С° в течение (23 ± 1) ч, центрифугировали при 10000 g в течение (25 ± 5) мин, осадок растворяли в 150 мл 0,1М фосфатного буфера рН 7,0 и диализовали против 50 объемов 0,1М фосфатного буфера рН 7,0 в течение (23 ± 1) ч. Полученный препарат (полуфабрикат ХТ) в объеме 100 мл содержал холерный токсин (титр в РДП 1:32, в ДИА ЗНЧ – 1:512) и следовые количества О-Аг (титр в РДП 1:2). Содержание белка по Лоури составило 1 мг/мл.

На втором этапе проводили дальнейшую очистку ХТ двумя различными способами.

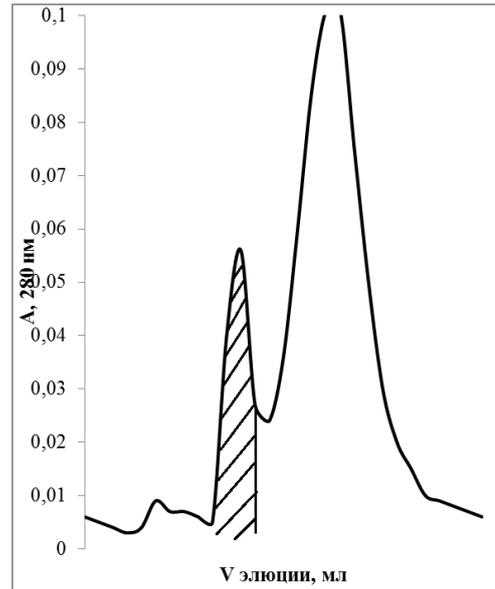
В первом случае полуфабрикат ХТ подвергали гельпроникающей хроматографии на колонке с TSK-гелем HW-60. Элюцию осуществляли 0,01М фосфатным буфером рН 7,0, фракционируя по 5 мл. Фракции анализировали спектрофотометрически при длине волны 280 нм и иммунохимическими методами в РДП и ДИА ЗНЧ с АХС и О1-сывороткой. Затем фракции, содер-

жащие ХТ, объединяли, концентрировали и вновь наносили на колонку. Было проведено три стадии очистки на TSK-геле HW-60. Полученный препарат ХТ (ХТ1) диализовали против 0,9 % NaCl.

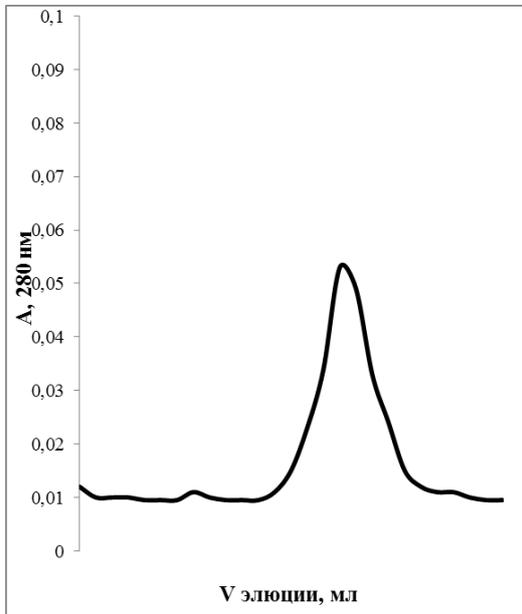
Во втором случае очистка ХТ проводилась последовательным освобождением полуфабриката от О-Аг путем фильтрации супернатанта через адсорбирующий двуслойный фильтр с положительным зарядом, который обеспечивает удаление отрицательно заряженных частиц, в том числе эндотоксинов. Данная процедура позволяет получать препарат, практически свободный от О-Аг. Далее полученный препарат подвергали гель-хроматографии на колонке с TSK-гелем HW-60. Элюцию осуществляли 0,01М фосфатным буфером рН 7,0, фракционируя по 5 мл. Фракции спектрофотометрировали при длине волны 280 нм и анализировали в РДП с СОП АХС и О1-сывороткой. Фракции, содержащие ХТ, объединяли и измеряли объем ($0,4 \pm 0,1$) л, полученный препарат ХТ (ХТ2) диализовали против 0,9 % NaCl. После процедуры адсорбирующей фильтрации количество О-Аг значительно уменьшалось, что видно по снижению высоты первого пика при проведении гель-хроматографии по сравнению с полуфабрикатом (рисунок 19Б). Данная процедура позволяет при хроматографической очистке получать препарат ХТ, практически свободный от О-Аг. Необходимо отметить, что незначительная часть ХТ также сорбировалась на фильтре, поэтому в дальнейшей работе для уменьшения сорбции веществ белковой природы, фильтр предварительно насыщали инертным белком – БСА. Результаты гельхроматографии полученных препаратов ХТ на колонке с TSK-гелем HW-60 представлены на рисунке 19. Общее время получения ХТ составило (26 ± 6) ч.



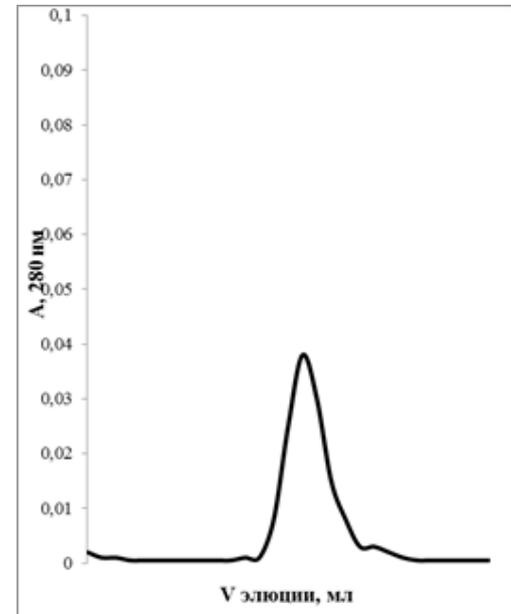
А



Б



В



Г

А – препарат после осаждения гексаметафосфатом натрия
(полуфабрикат ХТ);

Б – препарат после фильтрации через фильтр «CUNO 3M»;

В – препарат после фильтрации и хроматографии (ХТ2);

Г – препарат после 3-х кратной рехроматографии (ХТ1).

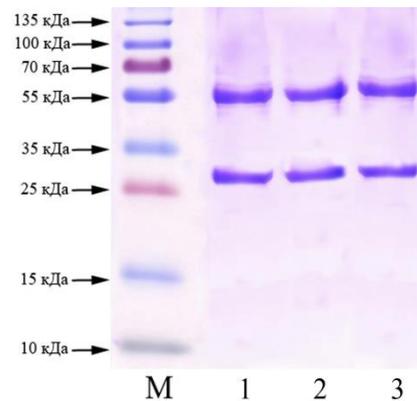
Рисунок 19 – Гель-хроматография препаратов ХТ из штамма *V. cholerae* 569В

в процессе очистки на колонке TSK- геля HW-60 (2,5 X 50 см)

(заштрихованный пик – содержание О-Аг)

Анализ препаратов ХТ1 и ХТ2 показал, что содержание белка после диализа и концентрирования составляло $(0,2 \pm 0,04)$ мг/мл, титр в РДП с СОП АХС $53,3 \pm 10,6$ (реципрокный), с О1-сывороткой – линий не выявлялось, что свидетельствует об отсутствии О-Аг. Активность препаратов ХТ1 и ХТ2 в кожной пробе по Крейгу была соответственно 10000 и 40000.

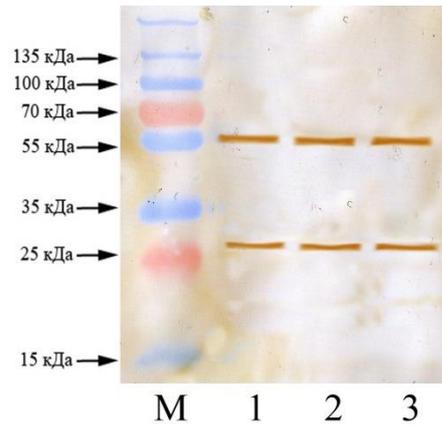
Также были исследованы электрофоретическая подвижность (рисунок 20) и иммунохимическая специфичность полученных препаратов в иммуноблоттинге с СОП АХС (рисунок 21). На электрофореграмме видны мажорные полосы молекулярной массой 55 кДа и 27 кДа. Иммунохимическая активность белковых полос также подтверждается иммуноблоттингом. Полученные данные свидетельствует о том, что белковые полосы ХТ соответствуют таковым СОП ХТ, выделенному по описанной ранее методике Mekalanos.



М – маркеры молекулярного веса, 1 – СОП ХТ,

2 – образец ХТ1, 3 – образец ХТ2

Рисунок 20 – Электрофореграмма образцов ХТ из штамма *V. cholerae* 569В в SDS-PAGE с окраской Кумасси R-250



М – маркеры молекулярного веса, 1 – СОП ХТ,
2 – образец ХТ1, 3 – образец ХТ2

Рисунок 21 – Иммуноблоттинг образцов ХТ из штамма *V. cholerae* 569В с СОП АХС

Учитывая более высокую специфическую активность препарата ХТ2 и применения однократного этапа гель-хроматографии для его выделения, был выбран второй способ получения препарата ХТ, отвечающего по своим качествам СОП ХТ.

Таким образом, в результате последовательного применения методов тангенциальной ультрафильтрации, дополнительной фильтрации через адсорбирующий фильтр и хроматографической очистки нами получен препарат СОП ХТ (ХТ2), который по своим свойствам соответствует ПР и может применяться для контроля специфических компонентов и готовой лекарственной формы.

5.2 Применения комплекса методов *in vitro* для проведения скрининга штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов холерного токсина

Потребность в препарате ХТ в производственном цикле вакцины весьма значительна, в связи, с чем научный интерес представляли эксперименты по получению ХТ из штаммов холерного вибриона с повышенной продукцией ХТ.

В данном исследовании в качестве кандидатов в штаммы *V. cholerae* – продуцентов ХТ использованы рекомбинантные штаммы *V. cholerae* классического биовара: штаммы *V. cholerae* КМ68, КМ76, КМ234 [Смирнова Н.И. и др., 1989; Щелканова Е.Ю. и др., 2007]; 9 природных геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор серовара Огава М-1298, М-1326, М-1328, М-1344, М-1345, М-1349, М-1463, М-1509, *V. cholerae* биовара Эль Тор серовара Инаба Р-18899 [Смирнова Н.И. и др., 2010].

Все изучаемые штаммы являются типичными для S-формы по морфологическим, культуральным, биохимическим, серологическим и токсигенными свойствами в опытах на лабораторных животных.

Для анализа стабильности признака токсигенности природных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор было изучено присутствие гена *ctxA* с использованием «Тест-системы для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (*ctxA*+) методом ПЦР (ГенХол)». Как показано на рисунке 22, во всех исследованных штаммах Эль Тор выявлены фрагменты ДНК, полосы которых расположены на том же уровне в геле, что и полоса в положительном контроле. Для холерных вибрионов, содержащих полноценный *ctxA*-ген, выявляется полоса 564 н.п.



К+ – положительный контроль; К- – отрицательный контроль;

1 – М-1509; 2 – Р-18899; 3 – М-1326; 4 – М-1328; 5 – М-1349;

6 – М-1298; 7 – М-1344; 8 – М-1463; 9 – М-1345;

10 – 569В (штамм сравнения)

Рисунок 22 – Выявление фрагмента ДНК размером полосы 564 н.п. у штаммов *V. cholerae* в образцах с использованием тест-системы ГенХол методом полимеразной цепной реакции

Продукция ХТ природными геновариантами *V. cholerae* биовара Эль Тор, а также рекомбинантных штаммов была изучена на среде АКІ. Штаммы культивировали в пробирках (3 мл) с аэрацией на термостатируемом шейкер-инкубаторе «BS ES-20» в течение (18,0±1,0) ч при температуре (37,0±0,1) С, 100 об/мин. Определение продукции ХТ проводили с помощью методов РПИГ и GM₁ ELISA с использованием тест-системы иммуноферментной для определения продукции ХТ штаммами *V. cholerae* (ИФАХолХТ-М), GM₁ ELISA и ПЦР. Результаты данных исследований представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Продукция ХТ природными и рекомбинантными штаммами *V. cholerae* (n=3)

Штаммы	Активность ХТ			
	РПИГ*	GM ₁ ELISA*	ИФАХолХТ-М	ПЦР
Природные штаммы				
<i>V. cholerae</i> М-1509	2,0±0,6	6,6±1,3	+	+
<i>V. cholerae</i> Р-18899	42,0±10,6	185,3±21,3	+	+
<i>V. cholerae</i> М-1326	21,0±5,6	26,6±5,3	+	+
<i>V. cholerae</i> М-1328	53,3±10,6	85,3±21,3	+	+
<i>V. cholerae</i> М-1349	42,6±10,6	85,3±21,3	+	+
<i>V. cholerae</i> М-1298	26,6±5,3	53,3±10,6	+	+
<i>V. cholerae</i> М-1344	21,3±5,3	42,6±10,6	+	+
<i>V. cholerae</i> М-1463	42,6±10,6	53,3±10,6	+	+
<i>V. cholerae</i> М-1345	21,3±5,3	42,6±10,6	+	+
Рекомбинантные штаммы				
<i>V. cholerae</i> КМ76	106,6±21,3	4266,6±1066,6	+	+
<i>V. cholerae</i> КМ68	256,0±128,0	5333,0±1066,6	+	+
<i>V. cholerae</i> КМ234	85,3±21,3	666,6±133,3	+	+
<i>V. cholerae</i> КМ197	85,3±21,3	533,0±133,3	+	+
Штамм сравнения				
<i>V. cholerae</i> 569В	106,6±21,3	666,6±133,3	+	+

Примечание: * реципрокный титр

Наибольшая продукция ХТ наблюдалась при выращивании рекомбинантных штаммов *V. cholerae*: КМ76, КМ68, КМ234, а также природных геновариантов штаммов *V. cholerae*: М-1463, Р-18899, М-1328, М-1349.

На следующем этапе работы определяли оптимальную питательную среду для культивирования каждого штамма, при использовании которой вы-

является наиболее высокий уровень биосинтеза ХТ. Было проведено сравнение продукции ХТ при культивировании вышеуказанных микроорганизмов на двух питательных средах: бульон казеиновый рН 7,6, традиционно используемый для глубинного культивирования штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М41 при производстве холерной химической вакцины и экспериментальная жидкая питательная среда на основе ФГФ. При культивировании рекомбинантных штаммов в питательные среды добавляли канамицин в концентрации 50 мкг/мл.

Эффективность жидких питательных сред определяли в условиях культивирования в колбах Эрленмейера (250 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе Infors Multitron при 150 об/мин в течение (18±1) ч при температуре (37,0±0,1) °С – для штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор и рекомбинантного КМ234, при температуре (32,0±0,1) °С – для штаммов *V. cholerae* 569В, КМ68, КМ76. Методами РПИГ и GM₁ ELISA был проведен сравнительный количественный анализ продукции ХТ (таблица 18).

Таблица 18 – Оценка уровня экспрессии ХТ природными и рекомбинантными штаммами *V. cholerae* на различных питательных средах (n=3)

Штамм	Среда	Содержание ХТ (реципрокный титр)	
		РПИГ	GM ₁ ELISA
<i>V. cholerae</i> М-1463	Фибриновый бульон	2,6±0,6	10,6±2,6
	Казеиновый бульон	2,0±0	6,6±1,3
<i>V. cholerae</i> Р-18899	Фибриновый бульон	48,0±16	85,3±21,3
	Казеиновый бульон	10,6±2,6	53,3±10,6
<i>V. cholerae</i> М-1328	Фибриновый бульон	2,0±0	6,6±1,3
	Казеиновый бульон	2,0±0	8,0±0
<i>V. cholerae</i> М-1349	Фибриновый бульон	8,0±0	53,3±10,6
	Казеиновый бульон	3,3±0,6	26,6±5,3
<i>V. cholerae</i> КМ234	Фибриновый бульон	26,6±5,3	128,0±0
	Казеиновый бульон	26,6±5,3	106,6±21,3
<i>V. cholerae</i> КМ68	Фибриновый бульон	213,3±42,3	426,6±106,6
	Казеиновый бульон	128,0±0	426,6±106,6
<i>V. cholerae</i> КМ76	Фибриновый бульон	106,6±21,3	266,6±53,3
	Казеиновый бульон	85,3±21,3	213,3±53,3
<i>V. cholerae</i> 569В	Фибриновый бульон	128,0±0	266,6±53,3
	Казеиновый бульон	85,3±21,3	133,3±26,6

При проведении сравнительного количественного анализа продукции ХТ методами РПИГ и GM₁ ELISA показано, что наибольшая продукция ХТ наблюдалась у штаммов *V. cholerae*: рекомбинантных – КМ68, КМ76; Эль Тор – Р-18899 и штамма-сравнения – 569В. По уровню продукции ХТ питательная среда на основе ФГФ не уступает питательной среде, которая используется для культивирования производственных штаммов, а в некоторых случаях превосходит ее. Таким образом, для дальнейшей работы была выбрана питательная среда на основе ФГФ.

Задача следующего этапа работы состояла в выявлении оптимальных условий синтеза ХТ при глубинном культивировании штаммов *V. cholerae* на среде на основе ФГФ. Для культивирования в условиях биореактора использовали штаммы *V. cholerae* КМ68, *V. cholerae* КМ76 и *V. cholerae* Р-18899. В качестве источника углеводного питания применяли 40 % раствор глюкозы. Подготовку посевной культуры проводили следующим образом: агаровую культуру пересеивали в пробирку с 5 мл бульона Хоттингера рН (7,6±0,1), подращивали в течение 6 ч при температуре (37,0±0,2) °С с аэрацией, затем вносили инокулят в колбу Эрленмейера (1 л) со 100 мл питательной среды (ФГФ, рН 8,0) и инкубировали в условиях шейкер-инкубатора при 150 об/мин в течение (17,0±1,0) ч при температуре (37,0±0,2) °С. Для посева в биореактор использовали данную бульонную культуру (100 мл). Выращивание проводили в течение (8,0±1,0) ч при температуре (32,0±0,2) °С с подкормкой 40 % раствора глюкозы. Культивирование холерных вибрионов в биореакторе прекращали при достижении стационарной фазы роста микробной популяции.

Было проведено три цикла культивирования каждого из штаммов холерного вибриона и проанализированы данные по динамике их роста (рисунок 23).

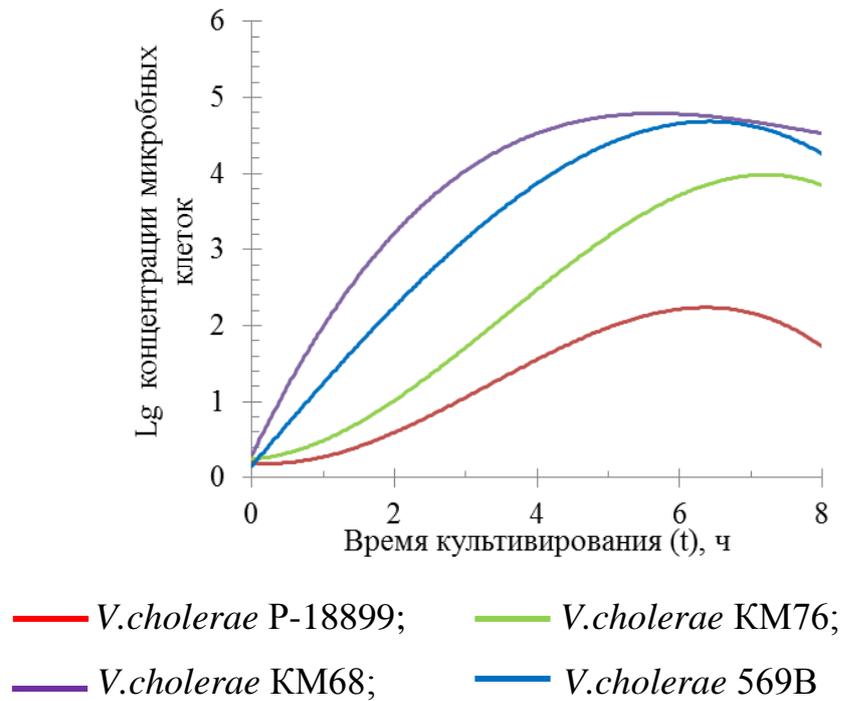


Рисунок 23 – Кривые роста штаммов *V.cholerae* – продуцентов ХТ в условиях биореактора на питательной среде на основе ФГФ

Анализ данных, представленных на рисунке 23, показывает, что процессы культивирования холерных вибрионов характеризовались рядом особенностей. Во-первых, время культивирования для всех рассматриваемых штаммов холерного вибриона составляет (7 ± 1) ч. Во-вторых, продолжительность фаз роста у анализируемых штаммов холерного вибриона была различна. Минимальная лаг-фазы составляла один час для штаммов *V.cholerae* 569B, *V.cholerae* KM 68, максимальная длительность экспоненциальной фазы роста составляла четыре часа для штаммов *V.cholerae* KM68, *V.cholerae* 569B, *V.cholerae* KM76; длительность стационарной фазы составляла два часа для всех представленных штаммов. В результате при культивировании в биореакторе наибольшая концентрация биомассы ($18,5 \pm 1,1$ м.к. млрд/мл) была у штамма *V. cholerae* KM68.

На рисунке 24 показана динамика продукции ХТ при аппаратном культивировании штаммов *V.cholerae*. Синтез ХТ у всех исследуемых штаммов к 4 ч культивирования был одинаков, а с 5 ч наблюдалось различие по выходу антигена. По достижению стационарной фазы роста максимальный выход ХТ

(титр в ДИА ЗНЧ составил $426,6 \pm 85,3$) наблюдался у штамма *V. cholerae* KM68.

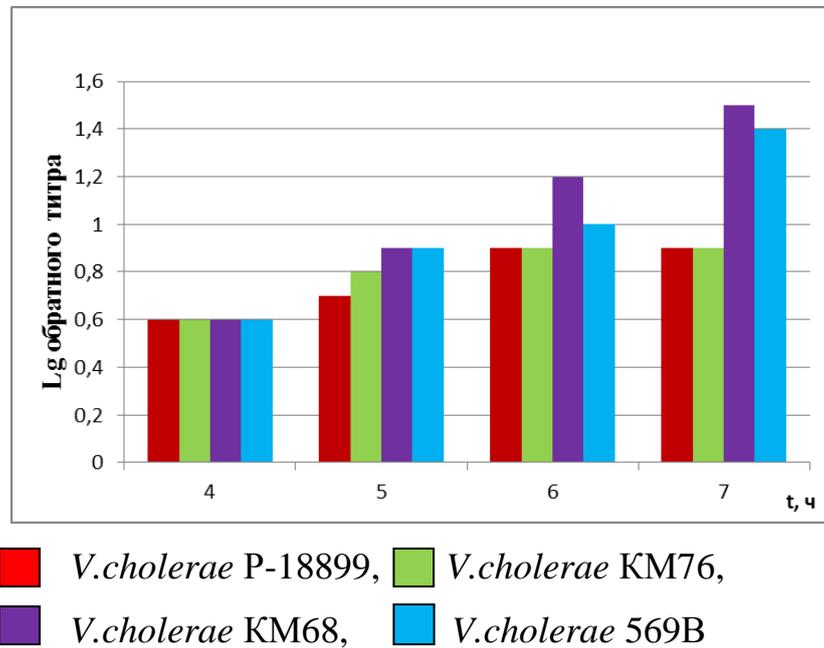


Рисунок 24 – Динамика содержания ХТ при аппаратном культивировании штаммов *V. cholerae*

Для дальнейшей работы использовали штамм *V. cholerae* KM68 в качестве продуцента ХТ.

В результате проведенных исследований был разработан методический подход для выбора штаммов *V. cholerae* с максимальной продукцией ХТ с использованием комплекса методов *in vitro*:

- с использованием тест-системы для выявления фрагмента ДНК размером полосы 564 н.п., соответствующего нуклеотидной последовательности *ctxA* гена;

- с помощью РПИГ и GM₁ ELISA изучение продукции ХТ у кандидатных штаммов;

- подбор оптимальной среды культивирования, при использовании которой отмечен высокий уровень биосинтеза ХТ;

- проведение глубинного культивирования в биореакторе для получения препаративного количества ХТ и подтверждение специфической активности ХТ на культуре клеток СНО-К1.

Совместное применение методов ПЦР, РПИГ, GM₁ ELISA, ДИА ЗНЧ и культуры клеток позволяет одновременно определить иммунохимическую и биологическую активность ХТ, а также молекулярно-генетическую стабильность штаммов *V. cholerae* – продуцентов ХТ.

5.3 Анализ препаратов холерного токсина, полученных по новой технологии

Для оптимизации способа получения ХТ были проведены исследования по апробации разработанного метода на штамме с повышенной продукцией антигена. Культивирование и выделение ХТ из штамма *V. cholerae* КМ68 проводили по ранее разработанным экспериментальным условиям, изложенным в подглавах 5.1 и 5.2. В качестве контроля использовали производственный штамм *V. cholerae* 569В (таблица 19).

Таблица 19 – Результаты культивирования штаммов *V. cholerae* – продуцентов ХТ (n=3)

Штамм <i>V. cholerae</i>	Концентрация м.к. млрд/мл	Содержание ХТ *	
		GM ₁ ELISA	ДИА ЗНЧ
569В	45,0±1,5	213,3±42,6	426,6±85,3
КМ68	43,2±1,4	341,3±85,3	682,6±170,6

Примечание: *реципрокный титр

На основании полученных данных можно сделать вывод, что уровень синтеза ХТ штаммом *V. cholerae* КМ68 был в 1,5 раза выше, чем штаммом *V. cholerae* 569В.

Далее проводили выделение ХТ из культуральной жидкости штамма *V. cholerae* КМ68 разработанным способом (п. 5.1). Активность ХТ на этапах его выделения отражена в таблице 20.

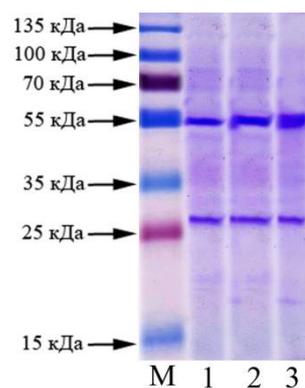
Таблица 20 – Контроль содержания и активность ХТ на этапах выделения (n=3)

Штамм <i>V. cholerae</i>	Стерильный фильтрат *			ХТ**					
				полуфабрикат		очищенный			
	GM ₁ ELISA	ДИА ЗНЧ	РПИГ	GM ₁ ELISA	ДИА ЗНЧ	GM ₁ ELISA	ДИА ЗНЧ	Актив- ность на клетках СНО-К1	Вы- ход (по бел- ку) мг
569В	213,3± 42,6	426,6± 85,3	256,0± 128,0	384,0± 128,0	426,6± 85,3	426,6± 85,3	682,6± 170,6	533,3± 106,6	5,0± 0,4
КМ68	341± 85,3	682,6± 170,6	384,0± 128,0	853,3± 170,6	682,6± 170,6	853,3± 213,3	1357,3 ±333,3	1066,6± 213,3	9,0± 0,5

Примечание: * безмикробный центрифугат после стерилизующей фильтрации
**реципрокный титр

Сравнительный анализ показал больший выход антигена из штамма *V. cholerae* КМ68 (9,0±0,5) мг/л.

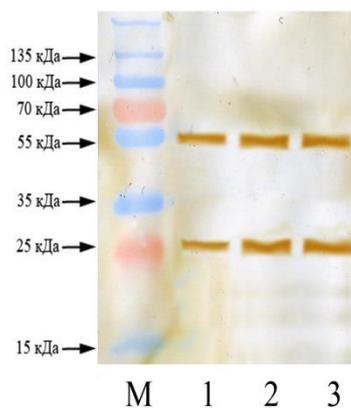
Образцы ХТ анализировали в белковом SDS-PAGE в денатурирующих условиях с последующим иммуноблоттингом с СОП АХС (рисунки 25 и 26).



М – маркеры молекулярной массы; 1 – образец сравнения (СОП ХТ);
 Препараты ХТ, полученные новым способом из штаммов *V. cholerae*:
 2 – 569В; 3 – КМ68

Рисунок 25 – Электрофореграмма образцов ХТ из штаммов *V. cholerae*
 в SDS-PAGE с окраской Кумасси R-250

В очищенных препаратах выявлены специфические полосы, характерные для токсина, выделенного по классическому способу (27 и 58 кДа).



М – маркеры молекулярной массы; 1 – образец сравнения (СОП ХТ);
 Препараты ХТ, полученные новым способом из штаммов *V. cholerae*:
 2 – 569В; 3 – КМ68

Рисунок 26 – Иммуноблоттинг образцов ХТ из штаммов *V. cholerae* с
 СОП АХС

По содержанию белка и специфической активности препараты ХТ соответствовали СОП ХТ для контроля этапов производства холерной химической вакцины (таблица 21).

Сравнительный анализ показал, что специфическая активность ХТ из штамма *V. cholerae* КМ68 была большей, чем из штамма *V. cholerae* 569В. По своим характеристикам полученный антиген соответствовал препарату СОП ХТ по показателям активности в каждой пробе по Крейгу и содержанию белка. Так, если нормируемая активность СОП ХТ должна составлять не менее 1:16000 (0,006 мкг по белку), то активность ХТ из штамма *V. cholerae* КМ68 составила 1:120000 (0,0008 мкг по белку), а для контрольного штамма *V. cholerae* 569В – 1:40000 (0,0025 мкг по белку).

Таблица 21 – Сравнительный анализ свойств препаратов ХТ (n=3)

Свойства	СОП «Тест-токсин холерный»	ХТ (569В)	ХТ (КМ68)
Содержание белка (мг/мл)	0,2±0,02	0,2±0,02	0,2±0,02
Кожная проба по Крейгу	16000	40000	120000

В результате данного этапа исследования был разработан новый способ выделения ХТ, который соответствует СОП ХТ, используемого для контроля компонентов и готовой лекарственной формы холерной химической вакцины. Разработанный способ позволяет получать препарат ХТ из культуральной жидкости штаммов холерных вибрионов, перспективных по уровню продукции данного антигена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обострение эпидемической обстановки по холере в мире диктует необходимость совершенствования вакцинопрофилактики, поскольку она остается резервной и необходимой мерой в очагах холеры, в прерывании путей передачи и распространения инфекции. Современный уровень биотехнологических производств лекарственных препаратов требует использования методов контроля, позволяющих получать достоверную характеристику вакцин. Исходя из направления исследований данной работы, посвященной разработке методического подхода для контроля активных компонентов холерной химической вакцины, был проведен поиск методов *in vitro*, наиболее достоверно характеризующих специфическую активность антигенов и позволяющих контролировать биотехнологические продукты.

Российская холерная бивалентная химическая вакцина состоит из холерогена-анатоксина и О-антигенов холерного вибриона сероваров Инаба и Огава [Джапаридзе М.Н., 1993; Онищенко Г.Г., 2011; Горяев А.А., 2018]. При производстве вакцины используют методы проверки специфической активности компонентов на лабораторных животных. Активность ХТ тестируется методом кожной пробы по Крейгу, количество ХА в готовой лекарственной форме определяется по специфической активности антигена в реакции анатоксинсвязывания на кроликах.

Токсигенные свойства культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569В – продуцента ХТ в соответствии с ПР изучают на модели 3-х кроликов-сосунков на каждый биореактор. В связи с этим, были проведены эксперименты по отработке критериев оценки активности ХТ высокочувствительными методами *in vitro* (методом GM₁ ELISA и РПИГ). Для анализа были взяты образцы реакторной культуры *V. cholerae* 569В, полученные в результате глубинного культивирования в биореакторе. В результате выявлено, что коэффициент корреляции Пирсона GM₁ ELISA с кожной пробой по Крейгу составил 0,96, а между методами РПИГ и кожной пробой по Крейгу – 0,8. Таким образом, образцы реакторной культуры

штамма *V. cholerae* 569В считаются пригодными для дальнейшего выделения специфических антигенов при наличии: положительной реакции при определении в кожной пробе по Крейгу в разведении не менее 1:2000, положительной реакции РПИГ и GM₁ ELISA в разведениях не менее 1:8 и был выявлен фрагмент ДНК размером 564 н.п., соответствующего нуклеотидной последовательности *ctxA* гена, кодирующего А-субъединицу холерного токсина методом ПЦР. Применение сочетания методов ПЦР, РПИГ и GM₁ ELISA позволяет подтвердить токсигенность штаммов методами *in vitro*. Разработка данных критериев и внесение изменений в Регламенты производства № ПР 01898109-65-22/1000 и № ПР 01898109-65-22/10000 позволило заменить проверку токсичности образцов реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В на лабораторных животных методами *in vitro*.

Качество ХА определяется специфической активностью ХТ, продуцируемого штаммом *V. cholerae* 569В в среде выращивания при глубинном культивировании. В соответствии с ПР специфическая активность ХТ определяется методом кожной пробы по Крейгу. Была определена активность ХТ при серийном глубинном культивировании *V. cholerae* 569В экспрессным методом ДИА ЗНЧ и методом кожной пробы по Крейгу на кроликах. В результате установлено, что значения специфической активности ХТ имеют корреляцию между результатами в ДИА ЗНЧ и в кожной пробе по Крейгу. Корреляция регламентного метода с ДИА ЗНЧ составила 0,87. На основании многократных исследований, разработан нормативный показатель качества промежуточного продукта производства (ХТ) по ДИА ЗНЧ (не менее 1:8).

Поскольку перевиваемые клеточные линии позволяют оценить биологическую активность токсинов, выявляя до 20-30 пг/мл токсина, далее была изучена активность ХТ в образцах реакторной культуры на клеточной линии СНО-К1. При изучении активности реакторной культуры штамма *V. cholerae* 569В на линии клеток СНО-К1 в сравнении с методом кожной пробы по Крейгу установлена возможность оценки специфической активности ХТ.

Так, низкая специфическая активность образца, определяемая по кожной пробе по Крейгу (титр 1:24000) подтверждается и на модели линии клеток СНО-К1 (титр 1:80). В другом образце, показавшем высокую активность ХТ по кожной пробе по Крейгу (титр 1:128000) на модели линии клеток СНО-К1 также определен высокий титр (титр 1:1280). Установлено, что данные по активности ХТ в исследованных образцах реакторной культуры, полученные биологическим, иммунохимическим методами и с использованием культуры клеток, сопоставимы, коэффициент корреляции Пирсона составил 0,93 для кожной пробы по Крейгу.

В соответствии с ПР количество ХА определяется по специфической активности антигена методом анатоксиносвязывания на кроликах. Классический метод, проводимый на животных для определения специфической активности ХА весьма трудоемок и длителен в постановке. Для определения антигенной активности ХА на культуре клеток СНО-К1 проведено исследование серий ХА параллельно с реакцией анатоксиносвязывания. В результате установлено, что значения специфической активности ХА по анатоксиносвязыванию с помощью культуры клеток имеют положительную корреляцию с данными, полученными в реакции анатоксиносвязывания. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,82. Таким образом, экспериментально обоснована возможность использования перевиваемой клеточной линии СНО-К1 для оценки активности ХТ и определения антигенной активности ХА при производстве холерной химической вакцины.

На следующем этапе определяли активность ХА в готовой лекарственной форме. Был проведен анализ серий вакцины с помощью методов ДИА ЗНЧ и анатоксиносвязывания на содержание антигена. Время постановки составляло 2 ч для ДИА ЗНЧ, 24 ч для реакции анатоксиносвязывания. Результаты, полученные ДИА ЗНЧ, имели положительную корреляцию с данными, полученными методом анатоксиносвязывания (коэффициент корреляции Пирсона 0,8). На основании многочисленных экспериментов определено, что ак-

тивность ХА в ДИА ЗНЧ должна составлять не ниже 1:512, что соответствует 1:80000 в ЕС по НД.

Таким образом, в ходе проведенного исследования доказана возможность применения ДИА ЗНЧ для оценки активности антигенов в компонентах и готовой лекарственной форме вакцины.

Далее проводилась работа по оценке возможного использования культуры клеток СНО-К1 для тестирования специфической безвредности ХА. В соответствии с ПР специфическую безвредность компонента вакцины определяют методом внутрикишечного введения ХА кроликам-сосункам в количестве 100000 ЕС. Данный метод длителен по времени (3 суток).

Установлено количество ХА, которое не оказывает специфического повреждающего действия на клетки СНО-К1. Предложен нормативный показатель качества специфического компонента холерной химической вакцины – ХА по цитотоксическому воздействию на клетки линии СНО-К1 в реакции специфической безвредности: в концентрации 0,1 мг/мл ХА не должен оказывать повреждающее действие на клетки СНО-К1.

Специфическая безопасность холерной химической вакцины тестируется на кроликах. Вакцина специфически безопасна, если при внутрикожном введении кроликам разведения таблетки 1:6000 в объеме 0,1 мл не образуются или образуются папулы диаметром до 10 мм.

Была проведена работа по оценке возможного использования GM₁ ELISA для оценки специфической безопасности готовой лекарственной формы.

Для исследования были взяты образцы 8 серий вакцины. Параллельно определяли специфическую безвредность на взрослых кроликах и на плашках. На кроликах в разведении не более 1:6000 (60000 ЕС/мл) во всех взятых в работу сериях папулы не образовались, а в GM₁ ELISA отсутствовало специфическое окрашивание. В положительном контроле наблюдалось зелено-голубое окрашивание. Это указывает на то, что вакцина специфически безопасна.

В данных исследованиях разработан нормативный показатель качества промежуточного продукта производства (ХТ). Предложено заменить при производстве холерной химической вакцины метод определения токсигенности на животных на высокочувствительные и сопоставимые методы *in vitro* – экспрессный метод РПИГ и определение наличия гена *ctxA* методом ПЦР. Применение сочетания методов ПЦР и РПИГ позволило подтвердить токсигенность культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569В методами *in vitro* и на данном этапе производства холерной химической вакцины отказаться от использования животных.

С учетом полученных результатов, представленных в данном разделе, был разработан алгоритм и количественный критерий оценки показателей качества методов *in vitro* для контроля активности антигенов и готовой лекарственной формы холерной химической вакцины.

Во втором разделе работы с применением современных методов (АСМ и ТЭМ, полногеномного секвенирования, ДИА ЗНЧ, РПИГ) был проведен комплексный анализ стабильности штаммов – продуцентов при подготовке посевного материала и на этапе культивирования.

Для исследования были взяты образцы субкультур производственных штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* 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. В результате показано, что оба штамма на всех этапах культивирования по культуральным свойствам являлись типичными для S-формы, диссоциация не отмечалась. Методом световой микроскопии при окрашивании по Граму отмечена типичность формы бактерий во всех исследованных образцах, что подтверждено методом ТЭМ. Методом АСМ было определено, что морфометрические показатели микробных клеток штамма *V. cholerae* М-41 оставались практически неизменными в I–III пассажи по следующим показателям: длина – $(2,05 \pm 0,1)$ мкм, ширина – $(0,64 \pm 0,05)$ мкм, высота – $(0,26 \pm 0,03)$ мкм. Для

штамма *V. cholerae* 569В в процессе глубинного культивирования к 10 ч клетки в изменили свои линейные размеры в сторону увеличения длины с $(2,4 \pm 0,1)$ мкм до $(3,51 \pm 0,2)$ мкм. При этом высота $(0,255 \pm 0,02)$ мкм и ширина $(0,7 \pm 0,03)$ мкм не изменились. Шероховатость клеточной стенки у обоих штаммов оставалась практически неизменной.

В исследованных образцах реакторной культуры методом ПЦР с первого по десятый часы культивирования были выявлены фрагменты ДНК, свидетельствующие о наличии полноценного *ctxA*-гена (полоса 564 н.п.), что свидетельствует о стабильности производственных штаммов по показателю «токсигенность».

Анализ результатов полногеномного секвенирования показал, что в процессе подготовки посевного материала (I-III пассажей обоих штаммов) и после 10 ч культивирования в биореакторе структура генома исследованных штаммов полностью сохраняется. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей секвенированных образцов штаммов *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569В, отбираемых на разных этапах культивирования, не выявил отличий от соответствующего исходного варианта. Согласно данным ДИА ЗНЧ, наличие активных компонентов детектировалось с первого часа для О-Аг и с третьего часа для ХТ. Максимальная продукция антигенов наблюдалась в стационарной фазе роста (9-10 ч от начала выращивания) у обоих штаммов.

Таким образом, подтверждена стабильность основных свойств производственных штаммов комплексом микробиологических, иммунохимических, молекулярно-генетических методов и методов микроскопического анализа на всех этапах культивирования. Стабильность геномов штаммов опосредованно подтверждает стабильность производственных условий культивирования и качество производственного процесса. По результатам проведенных исследований штаммы *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 были депонированы как производственные линии природных штаммов, что согласуется со статьей 11 Федерального Закона от 30.12.2020 № 492-ФЗ «О биологиче-

ской безопасности», в соответствии с которой производственные штаммы подлежат обязательному депонированию.

Задачей следующего этапа исследования было изучение стабильности продукции антигенов при культивировании штаммов-продуцентов вакцины *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 средах на основе жидкой и сухой основы. В проведенных исследованиях был использован разработанный методический подход с использованием комплекса методов *in vitro* для контроля стабильности штаммов *V. cholerae* в процессе культивирования.

Был проведен ретроспективный анализ эффективности питательной среды – казеинового бульона – на основе жидкого гидролизата казеина, приготовленного лабораторным способом. В результате ретроспективного анализа за 5 лет (2013-2017 г.г.) было выявлено, что по показателю роста биомассы основа соответствовала требованиям ПР. По выходу специфических антигенов была выявлена большая вариабельность этого показателя (до 68,6 % для О-Аг и 44,8 % для ХА). Поэтому актуальным являлось изучение продукции антигенов при культивировании штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 на средах, приготовленных на стандартной основе, содержащей сухой ферментативный гидролизат казеина.

На первом этапе в условиях малообъемного культивирования было установлено, что содержание аминного азота в среде на основе ФГК должно быть не ниже 100 мг%. Далее было проведено по три цикла экспериментально-производственного выращивания штаммов *V. cholerae* в биореакторах на казеиновом бульоне на основе ФГК с различным содержанием аминного азота. В качестве среды сравнения использовали казеиновый бульон на основе ОРК. В процессе культивирования на всех взятых в анализ питательных средах поддерживали одинаковые условия культивирования, разработанные для производственного цикла.

Анализ полученных результатов показал, что по выходу биомассы все среды соответствовали требованиям ПР. Активность антигенов была макси-

мальной при использовании среды с ФГК, с содержанием аминного азота 150 мг%.

Следующим этапом исследования был сравнительный анализ выхода протективных антигенов, полученных при культивировании на питательных средах на основе ОРК и ФГК с содержанием аминного азота 150 мг%. Выявлено, что выход О-Аг, выделенного при культивировании на среде ФГК, составил в среднем $(651,6 \pm 103,4)$ г, при культивировании на среде 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 лиофилизированных антигенов также соответствовала требованиям ПР.

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

Переход на использование стандартных сухих компонентов питательных сред позволил сократить временные затраты на их приготовление и стандартизировать этап культивирования штаммов *V. cholerae*.

В третьем разделе работы представлены результаты разработки нового способа выделения ХТ для получения СОП ХТ.

В результате проведенных исследований был разработан эффективный способ, включающий применение ультрафильтрации и гель-хроматографии. Культуральная жидкость штамма *V.cholerae* 569В после стерилизующей фильтрации была подвергнута тангенциальной фильтрации через мембраны 100 кДа, концентрированию через мембраны 10 кДа и осаждению в изоточке в присутствии гексаметафосфата натрия. Диализованный осадок дополни-

тельно фильтровали через двуслойный адсорбирующий фильтр с положительным зарядом и подвергали гель-хроматографии на TSK-геле HW-60. Преимуществом метода гель-хроматографии по сравнению с ионообменной является относительная простота исполнения и отсутствие необходимости проведения диализа.

Анализ полученного после хроматографической очистки препарата токсина показал, что содержание белка составляло $(0,2 \pm 0,04)$ мг/мл, иммунохимическая активность с СОП АХС в РДП по Оухтерлони 1:32 до 1:64, с О-сывороткой тест был отрицательный, что свидетельствует об отсутствии О-Аг. Активность в кожной пробе по Крейгу составляла 1:40000 (0,0025 мкг по белку), что соответствует требованиям нормативной документации (1:16000 в кожной пробе по Крейгу). Также были исследованы электрофоретическая подвижность и иммунохимическая специфичность полученного препарата в иммуноблоттинге с АХС. На электрофореграмме визуализировались мажорные полосы молекулярной массой 55 и 27 кДа. Иммунохимически активные полосы также подтверждались иммуноблоттингом. Полученные данные свидетельствуют о том, что белковые комплексы токсина, полученного новым способом, соответствуют таковым у ХТ, выделенного по существующей технологии [Mekalanos J.J. et al., 1978].

Потребность в препарате ХТ в производственном цикле вакцины весьма значительна, поэтому были проведены исследования по получению ХТ из штаммов холерного вибриона с повышенной продукцией ХТ. Для выбора штаммов *V. cholerae* с максимальной продукцией ХТ был применен разработанный методический подход с использованием комплекса методов *in vitro*.

В качестве кандидатов в штаммы *V. cholerae* – продуцентов ХТ использованы рекомбинантные *V. cholerae* КМ68, КМ-76, КМ 234 и 9 природных геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор серовара Огава М-1298, М-1326, М-1328, М-1344, М-1345, М-1349, М-1463, М-1509, *V. cholerae* биовара Эль Тор серовара Инаба Р-18899. Был проведен анализ штаммов-продуцентов ХТ биовара Эль Тор на присутствие в хромосоме гена *ctxA* с использованием

тест-системы для выявления ДНК *V. cholerae* (ctxA+) и показано наличие гена ctxA у всех изученных штаммов.

Далее была изучена продукция ХТ у 9 природных геновариантов и 4 рекомбинантных штаммов *V. cholerae* на бульоне АКІ при малообъемном культивировании в течение 18 ч при температуре (37,0±0,2) °С. Определение продукции ХТ проводили с помощью методов РПИГ и GM₁ ELISA. Наибольшая продукция ХТ наблюдалась у штаммов *V. cholerae*: KM68, KM76, P-18899, M-1349, 569B.

На следующем этапе работы определяли оптимальную питательную среду для культивирования каждого штамма, при использовании которой выявляется наиболее высокий уровень биосинтеза ХТ. Было проведено сравнение продукции ХТ при культивировании на двух питательных средах: бульоне казеиновом рН 7,6, который традиционно используется для глубинного культивирования производственных штаммов *V. cholerae* 569B и *V. cholerae* M-41 и экспериментальной жидкой питательной среде на основе ФГФ. В результате сравнительного исследования определено, что по активности продукции штаммами ХТ питательная среда на основе ФГФ не уступает регламентной питательной среде, а, в некоторых случаях превосходит ее. Таким образом, для дальнейшей работы была выбрана питательная среда на основе ФГФ.

На следующем этапе работы были выявлены оптимальные условия для синтеза ХТ при глубинном культивировании штаммов на выбранной среде. Установлено, что глубинное культивирование в биореакторе с рабочим объемом 1 л с использованием 40 % глюкозы в качестве подкормки приводит к значительному накоплению биомассы к 7-8 ч культивирования. Методами GM₁ ELISA и РПИГ был проведен сравнительный анализ продукции ХТ и показано, что наибольшая продукция ХТ была у штаммов *V. cholerae* P-18899, KM68, KM76, 569B. ПЦР-анализ изучаемых штаммов показал стабильность признака «токсигенность» у всех штаммов.

Применение методического подхода с использованием комплекса методов *in vitro* позволило выбрать штамм *V. cholerae* с максимальной продукцией ХТ. Он включает в себя анализ штаммов на присутствие в хромосоме гена *ctxA*, далее продукция ХТ у кандидатных штаммов изучается с помощью методов РПИГ и GM₁ ELISA. На следующем этапе проводят выбор оптимальной среды для биосинтеза ХТ и глубинное культивирование в биореакторе. Специфичность ХТ подтверждается активностью в кожной пробе по Крейгу и специфичным действием на культуру клеток CHO-K1. Совместное применение методов ПЦР, РПИГ, GM₁ ELISA, ДИА ЗНЧ и культуры клеток позволяет одновременно определить иммунохимическую и биологическую активность ХТ, а также молекулярно-генетическую стабильность штаммов *V. cholerae* – продуцентов ХТ.

Далее проводили выделение ХТ из культуральной жидкости штамма *V. cholerae* KM68 разработанным способом. В качестве штамма сравнения использовали штамм *V. cholerae* 569В.

Сравнительный анализ показал, что выход ХТ из штамма *V. cholerae* KM68, который составил (9,0±0,5) мг, был больше, чем из производственного штамма *V. cholerae* 569В, значение которого было (5,0±0,4) мг. По своим характеристикам полученные антигены соответствовали СОП ХТ по показателям активности в кожной пробе по Крейгу. Так, если нормируемая активность СОП ХТ должна составлять не менее 1:16000 (0,006 мкг по белку), то из штамма *V. cholerae* 569В она составляла 1:40000 (0,0025 мкг по белку). Активность ХТ из штамма *V. cholerae* KM68 была 1:120000 (0,0008 мкг по белку).

Таким образом, разработанный способ позволяет получать препарат ХТ из культуральной жидкости различных штаммов холерного вибриона. При этом выявлено преимущество использования штамма *V. cholerae* KM68 и показана целесообразность его культивирования на питательной среде из ФГФ.

Подводя итоги исследований, представленных в диссертации, следует сказать следующее. В результате выполненной работы проведены исследова-

ния по оценке эффективности использования методов *in vitro* для оценки показателей специфической активности антигенов холерной химической вакцины. Оценена возможность замены методов *in vivo* на тесты *in vitro* при анализе содержания ХТ и определении его специфической активности на этапах производства холерной химической вакцины. Экспериментально обоснована возможность использования теста на клетках перевиваемой линии при производстве холерной химической вакцины – для оценки активности ХТ и определения антигенной активности специфической фракции ХА. В результате показана высокая степень соответствия полученных результатов между методами, применяемыми при производстве холерной химической вакцины и тестами с использованием клеточной культуры СНО-К1. Применение клеточной линии СНО-К1 наиболее перспективно для замены биомоделей на промежуточных этапах контроля активных компонентов холерной химической вакцины. Впервые разработаны нормативные показатели качества промежуточного продукта производства (специфической фракции ХА) по специфическому воздействию на клетки линии СНО-К1 в реакции анатоксина-связывания (нейтрализации) (не менее 2 000 ЕС в 1 мг фракции).

С применением современных методов отработан комплексный методический подход к оценке стабильности производственных штаммов *V.cholerae*, что согласуется с требованиями ГФ РФ XIV.

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. Замена в производстве холерной химической вакцины методов, связанных с использованием животных, на методы *in vitro* является перспективным направлением стандартизации методов контроля ИЛП. По результатам выполненной работы внесены изменения в Регламенты производства № ПР 01898109-65-22/1000 и № ПР 01898109-65-22/10000 «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой», утвержден-

ные директором ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора 05.12.2022 г.

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

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 анатоксино-связывания) 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, поз-

волившие 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».

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЕ	антитоксическая единица
АСМ	атомно-силовая микроскопия
АХС	антихолерогенная сыворотка
БСА	бычий сывороточный альбумин
ГКПБ	Государственная коллекция патогенных бактерий
ГФ	Государственная фармакопея
ДИА ЗНЧ	дот-иммуноанализ с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом
ЕС	единицы связывания холероген-анатоксина с антихолерогенной сывороткой
ИЛП	иммунобиологические лекарственные препараты
ИФА	иммуноферментный анализ
КОЕ	колониеобразующая единица
ЛПС	липополисахарид
м.к.	микробная клетка
НД	нормативная документация
НОММ	номинальная отсечка по молекулярной массе
н.п.	нуклеотидные пары
О-Аг	О-антиген
ОПобр	оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом
ОРК	основной раствор казеина
ОСО	отраслевой стандартный образец
ОФС	общая фармакопейная статья
ПР	промышленный регламент
ПЦР	полимеразная цепная реакция
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
ФСБ	фосфатно-солевой буфер
ХА	холероген-анатоксин
ХТ	холерный токсин
АВТS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
А-ХТ	А-субъединица холерного токсина
В-ХТ	В-субъединица холерного токсина
GM ₁ ELISA	иммуноферментный анализ с использованием ганглиозидов GM ₁
GMP	Надлежащая производственная практика (от Good manufacturing practice)
OMP	белки наружной мембраны (от outer membrane proteins)
SDS	додецилсульфат натрия
TCP	токсин-коррегулируемые пили адгезии (от toxin-coregulated pilus)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева, Л.П. Современные методические приемы очистки холерного токсина / Л.П. Алексеева, О.А. Якушева, В.П. Зюзина [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2019. – Т. 15. – № 1. – С. 5-10.
2. Антонычева, М.В. Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона / М.В. Антонычева, С.А. Нижегородцев, С.А. Еремин [и др.] // Патент № 2425866 РФ, МПК C12N 1/20, C12R 1/63; 2011.
3. Анисимов, П.И. Способ производства вакцины для профилактики холеры / П.И. Анисимов, А.К. Адамов, М.Н. Джапаридзе [и др.] // Патент № 2080121 РФ, МПК A61K39/00; 1997.
4. Береговых, В.В. Руководства ИСН для фармацевтической отрасли. Качество / пер. с англ. под ред. В.В. Береговых // ЦОП «Профессия», Санкт-Петербург, 2017. – 768 с.
5. Беспалова, И.А. Современное состояние специфической профилактики холеры / И.А. Беспалова, И.А. Иванова, Н.Д. Омельченко [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 55-61.
6. Бургасов, П.Н. Реактогенность и иммунологическая эффективность оральной химической холерной вакцины в опыте ревакцинации добровольцев / П.Н. Бургасов, А.А. Сумароков, М.Н. Джапаридзе [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 1979. – Т.5, № 69. – С. 5-9.
7. Гальцева, Г.В. Таксономия и идентификация холерных и других вибрионов: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 03.00.07 / Гальцева Галина Васильевна. – Саратов, 1995. – 66 с.
8. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / Перевод с англ. Ю.А. Данилова под редакцией Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова // М.: Практика, 1998. – 459 с.
9. Горяев, А.А. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики холеры / А.А. Горяев, Л.В. Саяпина, Ю.И. Обухов [и др.] // БИОпре-

параты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Т. 18, № 1(65). – С. 42-49.

10. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание. – М.: ФЭМБ. – 2018. – 7019 с.

11. Громова, О.В. Оптимизация процесса производства холерной химической таблетированной вакцины с помощью технологии ультрафильтрации / О.В. Громова, С.А. Нижегородцев, И.А. Дятлов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 109. – С. 71-74.

12. Громова, О.В. Фосфатазная активность в холерной химической вакцине и ее компонентах / О.В. Громова, И.А. Кузьмиченко, М.Н. Киреев [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – № 3 (113). – С. 58-60.

13. Девдариани, З.Л. Экспресс-диагностика токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* в дот-иммунологическом анализе с помощью моноклональных антител / З.Л. Девдариани, В.А. Федорова, Т.А. Аленкина // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 8. – С. 24-33.

14. Джапаридзе, М.Н. Иммунохимическая и биохимическая характеристика профилактического препарата против холеры холерогена-анатоксина / М.Н. Джапаридзе, А.А. Сумароков, Л.А. Мартенс [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1976. – № 5. – С. 32-37.

15. Джапаридзе, М.Н. О-антиген *Vibrio cholerae* серовара Огава, рекомендуемый для создания оральной холерной бивалентной химической вакцины / М.Н. Джапаридзе, Л.Т. Караева, А.А. Сумароков [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1981. – № 11. – С. 75-81.

16. Джапаридзе, М.Н. Биологическая и иммунологическая характеристика нвой оральной холерной бивалентной вакцины и результаты испытания на добровольцах / М.Н. Джапаридзе, Г.П. Никитина, Н.Р. Иванов [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1982. – № 11. – С. 29-33.

17. Джапаридзе, М.Н. Способ получения пероральной химической вакцины / М.Н. Джапаридзе, А.В. Наумов, М.В. Мелешенко [и др.] // Патент № 2076734 РФ, МПК А61К 39/00, А61К 35/76; 1993.
18. Дмитруха, Н.Н. Культура клеток как *in vitro* модель в токсикологических исследованиях / Н.Н. Дмитруха // *Medix Anti-Aging*. – 2013. – Т. 33, № 3. – С. 50-55.
19. Дыкман, Л.А. Золотые наночастицы: Синтез, свойства и биомедицинские применения / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев, С.Ю. Щеголев [и др.] // М.: Наука, 2008. – 318 с.
20. Дыкман, Л.А. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы / Л.А. Дыкман, Н.Г. Хлебцов // *Acta Naturae*. – 2011. – Т.3, № 2. – С. 36–58.
21. Дыкман, Л.А. Применение дот-анализа и иммунозолотых маркеров для экспресс-диагностики острых кишечных инфекций / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 1999. – № 4. – С. 93-94.
22. Дятлов, И.А. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителя особо опасных инфекций бактериальной природы / И.А. Дятлов, В.В. Кутырев, М.В. Храмов. – М., 2012. – 415 с.
23. Дятлов, И.А. Вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная (ВЧММ) / И.А. Дятлов, А.П. Анисимов, М.В. Храмов [и др.] // *Бактериология*. – 2018. – Т. 3, №1. – С. 74-76.
24. Евдокимова, В.В. Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры / В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук [и др.] // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2016. – Т. 61, № 5. – С. 303-307.
25. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях. Страсбург, 18 марта 1986 года [Серии европейских договоров – № 123] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://rm.coe.int/168007аба8> (дата обращения 31.05.2022).

26. Ерёмин, С.А. Методы и технологии культивирования холерного вибриона (обзор) / С.А. Ерёмин, Ю.А. Алёшина, А.В. Комиссаров [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – Вып. 4. – С. 95-101.

27. Ерохин, П.С. Современное состояние изучения ультраструктуры поверхности клеточной стенки микроорганизмов в условиях неблагоприятного воздействия факторов биотической и абиотической природы методами атомно-силовой микроскопии / П.С. Ерохин, Д.В. Уткин, Н.А. Осина [и др.] // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2016. – Т. 16, № 2. – С. 186-189.

28. Жигмонди, Р. Коллоидная химия / Р. Жигмонди // Харьков, Киев: Изд-во НК Снаба УССР, 1933. – 452 с.

29. Заднова, С.П. Изучение продукции основных факторов патогенности и иммуногенности различными штаммами *Vibrio cholerae* при их культивировании в производственных условиях / С.П. Заднова, О.А. Волох, И.М. Крепостнова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2007. – Вып. 93. – С. 51-55.

30. Иванова, И.А. Использование поверхностных структур холерного вибриона для специфической профилактики и диагностики холеры / И.А. Иванова, Б.Н. Мишанькин, И.А. Беспалова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 2. – С. 110-115.

31. Каркищенко, Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских целях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева // М.: Профиль–2С, 2010. – 358 с.

32. Ключева, С.Н. Иммунобиологическая характеристика В- субъединицы холерного токсина / С.Н. Ключева, Т.Н. Щуковская, Т.П. Шмелькова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – Вып. 113. – С. 67-70.

33. Кобзарь, А.И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников / А.И. Кобзарь // М.: Физматлит, 2006. – 816 с.

34. Комиссаров, А.В. Совершенствование технологии получения В-субъединицы холерного токсина / А.В. Комиссаров, С.А. Еремин, О.А. Волох [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 4. – С. 100-102.
35. Комиссаров, А.В. Способ получения холерогена-анатоксина / А.В. Комиссаров, С.А. Еремин, О.В. Громова [и др.] // Патент № 2535122 РФ, МПК А61К 39/106, А61Р 31/04; 2014.
36. Кузьмиченко, И.А. Мониторинг активности ферментов при производстве вакцины холерной бивалентной таблетированной / И.А. Кузьмиченко, О.В. Громова, М.Н. Киреев [и др.] // Биотехнология. – 2010. – № 2. – С. 87-92.
37. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин // М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
38. Леви, Д.Т. Оценка подлинности и стабильности вакцины БЦЖ методом мультиплексной ПЦР / Д.Т. Леви, Ю.И. Обухов, Н.В. Александрова [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2016. – Т. 16, №1. – С. 49-54.
39. Литусов, Н.В. Возбудитель холеры / Н.В. Литусов // Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: ГБОУ ВПО УГМА, 2013. – 52 с.
40. Маркина, О.В. Изучение биологического действия гемагглютинин/протеазы холерных вибрионов на модели культур клеток / О.В. Маркина, Е.В. Монахова, Л.П. Алексеева [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2007. – Вып. 94. – С. 58-61.
41. Маркина, О.В. GM₁-ДОТ-ИФА для выявления токсинпродуцирующих штаммов *Vibrio cholerae* / О.В. Маркина, Л.П. Алексеева, Телесмач Н.Р. [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – № 5. – С. 49-52.
42. Медуницын, Н.В. Государственная система оценки безопасности вакцин // Инф. Бюл. Вакцинация. – 2000. – Т. 8, № 2 – С. 3-4.
43. Микшис, Н.И. Определение соответствия прототипа рекомбинантной сибирезвенной вакцины требованиям, предъявляемым к иммуно-

биологическим препаратам / Н.И. Микшис, А.П. Семакова, П.Ю. Попова [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8, № 3. – С. 388-392.

44. Микшис, Н.И. Современное состояние проблемы разработки вакцин для специфической профилактики чумы / Н.И. Микшис, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – Вып. 1. – С. 50-63.

45. Михеева, Е.А. Получение и характеристика антителопродуцирующих гибридом и моноклональных иммуноглобулинов к энтеротоксину *Vibrio cholerae* / Е.А. Михеева, З.Л. Девдариани, Н.А. Осина [и др.] // Биотехнология. – 2014. – № 3. – С. 49–54.

46. Михеева, Е.А. Способ и набор для определения продукции холерного токсина и дифференциации эпидемически значимых штаммов холерных вибрионов классического и эльтор биоваров / Е.А. Михеева, Н.А. Осина, З.Л. Девдариани, С.А. Щербакова, В.В. Кутырев [и др.] // Патент № 2611359 РФ, МПК G01N 33/53, 2017.

47. Мишанькин, Б.Н. Мембранный белок ОтрГ холерного вибриона как возможный компонент химической вакцины / Б.Н. Мишанькин, И.А. Иванова, О.В. Дуванова [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 114.

48. Мовсесянц, А.А. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов – новое в Государственной фармакопее Российской Федерации / А.А. Мовсесянц, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2016. – № 2. – С. 38-41.

49. Москвитина, Э.А. Прогноз по холере на 2019 г. на основании анализа эпидемиологической обстановки в мире, СНГ и России в 2009–2018 гг. / Э.А. Москвитина, Е.Г. Янович, В.Д. Кругликов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 1. – С. 64-73.

50. Москвитина, Э.А. Холера и холерные вибрионы: состояние проблемы, 2016 год / Э.А. Москвитина, С.В. Титова, В.Д. Кругликов // Сборник

трудов конференции «Холера и патогенные для человека вибрионы». – Ростов-на-Дону: ООО «Мини Тайп», 2016. – С. 29-33.

51. Москвитина, Э.А. Холера: мониторинг эпидемиологической обстановки в мире и России (2010–2019 гг.). Прогноз на 2020 г. / Э.А. Москвитина, Е.Г. Янович, М.Л. Куриленко [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 2. – С. 38-47.

52. МУ 3.3.1.2075-06 Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона. Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. – 67 с.

53. МУ 3.3.2.2124-06 Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, теляремии, бруцеллеза, легионеллеза. Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. – 35 с.

54. МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 69 с.

55. МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 51 с.

56. МУ 1.3.3103-13 Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I–IV групп патогенности. Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013. – 20 с.

57. Никифоров, А.К. Разработка питательных сред на основе непищевого сырья для глубинного культивирования штаммов холерного вибрио-

на / А.К. Никифоров, М.В. Антонычева, О.А. Волох [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 1. – С. 85-88.

58. Носков, А.К. Холера: тенденции развития эпидемического процесса в 2021 г., прогноз на 2022 г. / А.К. Носков, В.Д. Кругликов, Э.А. Москвитина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 1. – С. 24–34.

59. Носков, А.К. Холера: анализ и оценка эпидемиологической обстановки в мире и России. Прогноз на 2023 г. / А.К. Носков, В.Д. Кругликов, Э.А. Москвитина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 1. – С. 56–66.

60. Онищенко, Г.Г. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации / Г.Г. Онищенко, А.Ю. Попова, В.В. Кутырев [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 1. – С. 89-101.

61. Онищенко, Г.Г. Специфическая профилактика холеры в современных условиях / Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев, Т.Н. Щуковская [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – Вып. 107, № 1. – С. 5-12.

62. Острашевская, Е.В. Изучение генетической стабильности субштамма *M.bovis* BCG-1 (Russia) в процессе производства вакцины БЦЖ / Е.В. Острашевская, В.Н. Винокурова, Е.А. Шитиков [и др.] // Журн. микробиол. – 2018. – № 2. – С. 58-67.

63. ОФС.1.7.1.0010.18 Биологические лекарственные препараты Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том II). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 2619-2636.

64. ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том II). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 2545-2554.

65. ОФС.1.7.1.0007.15 Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантной ДНК. Общая фармакопейная статья / Государственная

Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том II). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 2575-2595.

66. ОФС.1.7.1.0008.15 Пробиотики. Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том II). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 2596-2608.

67. ОФС.1.7.1.0013.18 ДНК вакцины. Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том II). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 2658-2671.

68. ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том II). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 2717-2728.

69. ОФС.1.7.1.0011.18 Биотехнологические лекарственные препараты. Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том II). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 2637-2643.

70. ОФС.1.7.2.0012.15 Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков. Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том II). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 2852-2900.

71. Петрова, Е.Э. Получение и характеристика моноклональных антител к холерному токсину / Е.Э. Петрова, Р.Л. Комалева, О.Е. Лахтина [и др.] // Биоорганическая химия. – 2009. – Т. 35, № 3. – С. 357-367.

72. Пименова, Е.В. Изучение потенциальной токсичности антигенов *Burkholderia pseudomallei* на модели перевиваемых клеточных культур / Е.В. Пименова, Н.П. Храпова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 7. – С. 247-250.

73. Пименова, Е.В. Разработка метода оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* на модели перевиваемых клеточных культур: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03 / Пименова Екатерина Владимировна. – Волгоград, 2016. – 24 с.

74. Положение о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев): [Российская Академия медицинских наук, Министерство здравоохранения Российской Федерации] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.scbmt.ru/mag/polojenie.pdf> (дата обращения 31.05.2022).

75. Полтавченко, А.Г. Выбор системы детекции для мультиплексного дот-иммуноанализа антител / А.Г. Полтавченко, А.В. Ерш, Ю.А. Крупницкая // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61, №4. – С. 229-233.

76. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 (ред. От 18.12.2015) об утверждении Правил надлежащей производственной практики [Министерство промышленности и торговли Российской Федерации] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://base.garant.ru/70451198/> (дата обращения 31.05.2022).

77. Приказ от 6.12.2021 г. № 1122н об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок [Министерство здравоохранения Российской Федерации] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/727605537?marker=6520IM> (дата обращения 31.05.2022).

78. Решение от 3.11.2016 г. № 77 об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза [Совет Евразийской экономической комиссии] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/npafiles/2021/10/22/pravila_nadlezhashchey_proizvodstvennoy_praktiki.pdf (дата обращения 22.12.2022)

79. Сальникова, О.И. Культура клеток в изучении и тестировании токсинов холерного вибриона: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Сальникова Ольга Ивановна. – Саратов, 1994. – 22 с.

80. СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. – М., 2021. – 1092 с.
81. Саяпина Л.В. Совершенствование подходов по верификации вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения / Л.В. Саяпина, Н.А. Осина, Е.А. Нарышкина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 3. – С. 137-144.
82. Сенявина, Н.В. Современные технологии тестирования лекарств *in vitro*: использование микробиореакторов / Н.В. Сенявина, Е.В. Трушкин, А.Л. Русанов [и др.] // Биотехнология. – 2013. – № 1. – С. 51-58.
83. Смирнова, Н.И. Штамм бактерий *Vibrio cholerae cholerae* серовара Огава-продуцент холерного токсина / Н.И. Смирнова, Л.Ф. Ливанова, А.Л. Гинцбург [и др.] // Патент № 1456468 СССР, МПК С12N1/20, С12N15/00, А61К35/74, С12N1/20, С12R1/63; 1989.
84. Смирнова, Н.И. Штамм бактерий *Vibrio cholerae cholerae* серовара Инаба, используемый в качестве продуцента холерного токсина / Н.И. Смирнова, Л.Ф. Ливанова, А.Л. Гинцбург [и др.] // Патент № 1460075 СССР, МПК С12N1/20, С12N1/20, С12R1/63; 1989.
85. Смирнова, Н.И. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период / Н.И. Смирнова, А.А. Горяев, В.В. Кутырев // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 2010. – № 4. – С. 11-19.
86. Сырова, Н.А. Получение, характеристика и биотехнологические аспекты применения поли- и моноклональных антител к антигенам *Vibrio cholerae* O1 Инаба и Огава: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07, 03. 00. 23 / Сырова Наталия Алексеевна – Саратов, 2005. – 156 с.
87. Телесманич, Н.Р. Конструирование антилипазного иммуноглобулинового полимерного диагностикума для выявления холерных вибрионов Эль Тор, обладающих гемолитической и липазной активностью / Н.Р. Телесманич, Ю.М. Ломов, В.В. Агафонова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 1. – С. 57-60.

88. Тертон, М. Новые методы иммуноанализа / М. Тертон, Д.Р. Бангхем, К.А. Колкотт [и др.]; под общ. ред. У. Коллинза // М.: Мир, 1991. – 280 с.
89. Титова, С.В. Роль биопленок в выживаемости и сохранении вирулентности холерных вибрионов в окружающей среде и организме человека / С.В. Титова, Л.П. Алексеева, И.Т. Андрусенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 3. – С. 88-97.
90. Уткин, Д.В. Разработка методических подходов изучения возбудителей особо опасных инфекционных болезней методом атомно-силовой микроскопии / Д.В. Уткин, О.С. Кузнецов, П.С. Ерохин [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – Вып. 112, № 2. – С. 62-64.
91. Уткин, Д.В. Исследование морфологических особенностей клеток бактерий *Yersinia pestis*, выращенных при различных температурных условиях, методом атомно-силовой микроскопии / Д.В. Уткин, Е.Г. Булгакова, П.С. Ерохин [и др.] // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2019. – Т. 19, вып. 1. – С. 87-93.
92. Федеральный закон от 30.12.2020 № 492-ФЗ О биологической безопасности [Совет Федерации][Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202012300021?index=0&rangeSize=1> (дата обращения 12.05.2023).
93. Федорова, В.А. Динамика синтеза протективных антигенов в процессе глубинного культивирования *Vibrio cholerae* / В.А. Федорова, Н.А. Сырова, О.В. Громова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2000. – № 6. – С. 72-74.
94. ФС.3.3.1.0020.15 Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том II). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 5326-5336.
95. Фрешни, Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р.Я. Фрешни // М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.

96. Челдышова, Н.Б. Анализ результатов фрагментарного и полногеномного секвенирования атипичных штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара, вызвавших вспышку азиатской холеры в России / Н.Б. Челдышова, А.А., Крицкий, Я.М. Краснов, Н.И. Смирнова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015. – № 5, Т. 20. – С. 24-31.

97. Шагинян, И.А. Модификация метода пассивного иммунного гемолиза на плотной среде для выявления продукции термолабильных энтеротоксинов штаммами холерных вибрионов и кишечной палочки / И.А. Шагинян, Б.Н. Маракуша // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1983. – № 2. – С. 92-96.

98. Щелканова, Е.Ю. Штамм бактерий *Vibrio cholerae* – продуцент холерного токсина II типа / Е.Ю. Щелканова, А.А. Горяев, С.П. Заднова, Н.И. Смирнова // Патент № 2326941 РФ, МПК С12N 1/20, С12R 1/63; 2007.

99. Щуковская, Т.Н. Вакцинопрофилактика холеры: современное состояние вопроса / Т.Н. Щуковская, Л.В. Саяпина, В.В. Кутырев // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2009. – № 2. – С. 62-67.

100. Aktar, A. Plasma and memory B cell responses targeting O-specific polysaccharide (OSP) are associated with protection against *Vibrio cholerae* O1 infection among household contacts of cholera patients in Bangladesh / A. Aktar, M.A. Rahman, S. Afrin [et al.] // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2018. – Vol. 12, № 4. – P. e0006399.

101. Akkermans, A. Animal testing for vaccines. Implementing replacement, reduction and refinement: challenges and priorities / A. Akkermans, J.-M. Chapsal, E. M. Coccia [et al.] // Biologicals. – 2020. – № 68. – P. 92–107.

102. Ali, M. Updated global burden of cholera in endemic countries / M. Ali, A.R. Nelson, A.L. Lopez [et al.] // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2015. – Vol. 9, № 6. – P. e0003832.

103. Arimitsu, H. Immunochromatographic detection of the heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* with cross-detection of cholera toxin /

H. Arimitsu, K. Sasaki, T. Tsuji // J. Microbiol. Methods. – 2017. – Vol. 132. – P. 148-152.

104. Balakrishnan, V.Sh. Cholera in Yemen / V.Sh. Balakrishnan // Lancet Infect. Dis. – 2017. – Vol. 17, № 7. – P. 700–701.

105. Balasubramanian, D. Cholera dynamics: lessons from an epidemic / D. Balasubramanian, S. Murcia, C.B. Ogbunugafor [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2021. – Vol. 70, № 2. – P. 001298.

106. Baldauf, K.J. Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications / K.J. Baldauf, J.M. Royal, K.T. Hamorsky [et al.] // Toxins (Basel). – 2015. – Vol. 7, № 3. – P. 974-996.

107. Banerjee, T. cAMP-Independent activation of the unfolded protein response by cholera toxin / T. Banerjee, A. Grabon, M. Taylor [et al.] // Infect. Immun. – 2021. – Vol. 89, № 2. – P. e00447-20.

108. Baranova, D.E. Transcriptional profiling of *Vibrio cholerae* O1 following exposure to human anti-lipopolysaccharide monoclonal antibodies / D.E. Baranova, G.G. Willsey, K.J. Levinson [et al.] // Pathog. Dis. – 2020. – Vol. 78, № 4. – P. ftaa029.

109. Basu, I. Insights into binding of cholera toxin to GM1 containing membrane / I. Basu, Ch. Mukhopadhyay // Langmuir. – 2014. – Vol. 30, № 50. – P. 15244-15252.

110. Beddoe, T. Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins / T. Beddoe, A.W. Paton, J. Le Nours [et al.] // Trends Biochem. Sci. – 2010. – Vol. 35, № 7. – P. 411-418.

111. Bharati, K. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein / K. Bharati, N.K. Ganguly // Indian J. Med. Res. – 2011. – Vol. 133, № 2. – P. 179–187.

112. Bishop, A.L. *Vibrio cholerae*: lessons for mucosal vaccine design / A.L. Bishop, A. Camilli // Expert Rev. Vaccines. – 2011. – Vol. 10, № 1. – P. 79-94.

113. Bramucci, M.G. Radial passive immune hemolysis assay for detection of heat-labile enterotoxin produced by individual colonies of *Escherichia coli* or *Vibrio cholera* / M.G. Bramucci, R.K. Holmes // J. Clin. Microbiol. – 1978. – Vol. 8, № 2. – P. 252–255.
114. Broeck, D.V. *Vibrio cholerae*: cholera toxin / D.V. Broeck, C. Horvath, M.J.S. de Wolf // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2007. – Vol. 39, № 10. – P. 1771-1775.
115. Cabrera, A. Vaxchora: A Single-Dose Oral Cholera Vaccine / A. Cabrera, J.E. Lepage, K.M. Sullivan [et al.] // Ann. Pharmacother. – 2017. – Vol. 51, № 7. – P. 584-589.
116. Cervin, J. GM1 ganglioside-independent intoxication by cholera toxin / J. Cervin, A.M. Wands, A. Casselbrant [et al.] // PLoS Pathog. – 2018. – Vol. 14, № 2. – P. e1006862.
117. Charles, R.C. Humans surviving Cholera develop antibodies against *Vibrio cholerae* O-Specific polysaccharide that inhibit pathogen motility / R.C. Charles, M. Kelly, J.M. Tam [et al.] // mBio. – 2020. – Vol. 11, № 6. – P. e02847-20.
118. Charles, R.C. Immunogenicity of a killed bivalent (O1 and O139) whole cell oral cholera vaccine, Shanchol, in Haiti / R.C. Charles, I.J. Hilaire, L.M. Mayo-Smith [et al.] // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2014. – Vol. 8, № 5. – P. e2828.
119. Chatterjee, S. Phenotypic and genotypic traits and epidemiological implication of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains in India during 2003 / S. Chatterjee, K. Ghosh, A. Raychoudhuri [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2007. – Vol. 56, № 6. – P. 824-832.
120. Chinnapen, D.J-F. Rafting with cholera toxin: Endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER / D.J-F. Chinnapen, H. Chinnapen, D. Saslowsky [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – Vol. 266, № 2. – P. 129-137.

121. Chiricozzi, E. On the use of cholera toxin / E. Chiricozzi, L. Mauri, M.G. Ciampa [et al.] // *Glycoconj. J.* – 2018. – Vol. 35, № 2. – P. 161-163.

122. Chowdhury, F. A non-inferiority trial comparing two killed, whole cell, oral cholera vaccines (Cholvax vs. Shanchol) in Dhaka, Bangladesh / F. Chowdhury, A. Akter, T.R. Bhuiyan [et al.] // *Vaccine.* – 2022. – Vol. 40, № 4. – P. 640-649.

123. Clemens, J.D. Cholera / J.D. Clemens, G.B. Nair, T. Ahmed [et al.] // *Lancet.* – 2017. – Vol. 390, № 10101. – P. 1539–1549.

124. Craig, J.P. Preparation of the vascular permeability factor of *Vibrio cholerae* / J.P. Craig // *J. Bacteriol.* – 1966. – Vol. 92, № 3. – P. 793-795.

125. Davis, W. Cholera / W. Davis, R. Narra, E.D. Mintz // *Curr. Epidemiol. Rep.* – 2018. – Vol. 5, № 3. – P. 303-315.

126. Deen, J. Epidemiology of cholera / J. Deen, M.A. Mengel, J.D. Clemens // *Vaccine.* – 2020. – Vol. 38, suppl. 1. – P. A31–A40.

127. Dembiński, Ł. Immunogenicity of cholera vaccination in children with inflammatory bowel disease / Ł. Dembiński, A. Stelmaszczyk-Emmel, K. Sznurkowska [et al.] // *Hum Vaccin Immunother.* – 2021. – Vol. 17, № 8. – P. 2586-2592.

128. Dukoral (cholera vaccine, inactivated oral). An overview of Dukoral and why it is authorised in the EU [European Medicines Agency] [Electronic resource]. – Режим доступа: http://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/dukoral-epar-summary-public_en.pdf (дата обращения 23.11.2021).

129. Dutta, N.K. Experimental cholera in infant rabbits: a method for chemotherapeutic investigation/ N.K. Dutta, M.K. Habbu // *Br. J. Pharmacol. Chemother.* – 1955. – Vol. 10, № 2. – P. 153-159.

130. Dutta, D. *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Kolkata, India / D. Dutta, G. Chowdhury, G.P. Pazhani [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 19, № 3. – P. 464-467.

131. Edwards, K.A. GM1-functionalized liposomes in a microtiter plate assay for cholera toxin in *Vibrio cholerae* culture samples / K.A. Edwards, J.C. March // *Analytical Biochemistry*. – 2007. – Vol. 368, № 1. – P. 39–48.

132. Ehara, M. Immunogenicity of *Vibrio cholera* O1 fimbriae in animal and human cholera / M. Ehara, Y. Ichinose, M. Iwami [et al.] // *Microbiol. Immunol.* – 1993. – Vol. 37. – P. 679-688.

133. Eneva, R.T. High production of neuraminidase by a *Vibrio cholerae* Non-O1 strain – the first possible alternative to toxigenic producers / R.T. Eneva, S.A. Engibarov, P. Petrova [et al.] // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 176, № 2. – P. 412-427.

134. European Pharmacopeia. 8th ed. Supplement 8.0. – 2013. – P. 3655.

135. European Pharmacopeia. 10th ed. Supplement 10.0. – 2019. – P. 4318.

136. Fan, E. AB(5) toxins: structures and inhibitor design / E. Fan, E.A. Merritt, C.L. Verlinde [et al.] // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 10, № 6. – P. 680-686.

137. Fan, Y. Nonhemolysis of epidemic El Tor biotype strains of *Vibrio cholerae* is related to multiple functional deficiencies of hemolysin A / Y. Fan, Zh. Li, Z. Li [et al.] // *Gut Pathog.* – 2019. – Vol. 11. – P. 38.

138. Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions / G. Frens // *Nature Physical Science*. – 1973. – Vol. 241, № 105. – P. 20-22.

139. Fullner, K.J. *Vibrio cholerae*-induced cellular responses of polarized T84 intestinal epithelial cells are dependent on production of cholera toxin and the RTX toxin / K.J. Fullner, W.I. Lencer, J.J. Mekalanos // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69, № 10. – P. 6310–6317.

140. Ganesan, D. Cholera surveillance and estimation of burden of cholera / D. Ganesan, S.S. Gupta, D. Legros // *Vaccine*. – 2020. – Vol. 38, suppl. 1. – P. A13-A17.

141. Ghazi, F.M.P. Development of lipopolysaccharide-mimicking peptides and their immunoprotectivity against *Vibrio cholerae* serogroup O1 /

F.M.P. Ghazi, S.L.M. Gargari // J. Pept. Sci. – 2016. – Vol. 22, № 11–12. – P. 682–688.

142. Ghosh, A. Enterotoxigenicity of mature 45-kilodalton and processed 35-kilodalton forms of haemagglutinin protease purified from a cholera toxin gene-negative *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain / A. Ghosh, D.R. Saha, K.M. Hoque [et al.] // Infect. Immun. – 2006. – Vol. 74, № 5. – P.2937-2946.

143. Ghosh, A. The role of *Vibrio cholerae* haemagglutinin protease (HAP) in extra-intestinal infection / A. Ghosh, H. Koley, A. Pal // J. Clin. Diagn. Res. – 2016. – Vol. 10, № 9. – P. DC10-DC14.

144. Guerrant, R.L. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* / R.L. Guerrant, L.L. Brunton, T.C. Schnaitman[et al.] // Infection and immunity – 1974. – Vol. 10, № 2. – P. 320-327.

145. Haigh, J.L. A versatile cholera toxin conjugate for neuronal targeting and tracing / J.L. Haigh, D.J. Williamson, E. Poole [et al.] // Chem. Commun. (Camb). – 2020. – Vol. 56, № 45. – P. 6098-6101.

146. Harris, J.B. Cholera / J.B. Harris, R.C. LaRocque, F. Qadri [et al.] // Lancet. – 2012. – Vol. 379, № 9835. – P. 2466–2476.

147. Hartmann, M. Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy / M. Hartmann, M. Berditsch, J. Hawecker [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2010. – V. 54. – № 8. – P. 3132-3142.

148. Heggelund, J.E. *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and beyond / J.E. Heggelund, V.A. Bjornestad, U. Krengel // In: The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. 4th edition. – San Diego: Elsevier Academic Press, 2015. – P. 195-229.

149. Howell, M. Functional characterization of a subtilisin-like serine protease from *Vibrio cholera* / M. Howell, D.G. Dumitrescu, L.R. Blankenship [et al.] // J. Biol. Chem. – 2019. – Vol. 294, № 25. – P. 9888-9900.

150. Hsueh, B.Y. Combating Cholera / B.Y. Hsueh, Ch.M. Waters // F1000Res. – 2019. – Vol. 8. – P. F1000 Faculty Rev-589.
151. Islam, Md.T. Trials of the killed oral cholera vaccine (Shanchol) in India and Bangladesh: Lessons learned and way forward / Md.T. Islam, F. Chowdhury, F. Qadri [et al.] // Vaccine. – 2020. – Vol. 38, suppl. 1. – P. A127-A131.
152. Iwanaga, M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor / M. Iwanaga, K. Yamamoto, N. Higa [et al.] // Microbiol. Immunol. – 1986. – Vol. 30, № 11. – P. 1075-1083.
153. Jin, D. Quantitative detection of *Vibrio cholerae* toxin by real-time and dynamic cytotoxicity monitoring / Jin, D. U. Luo, M. Zheng, [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2013. – Vol. 51, № 12. – P. 3968-3974.
154. Jobling, M.G. A single native ganglioside GM1-binding site is sufficient for cholera toxin to bind to cells and complete the intoxication pathway / M.G. Jobling, Zh. Yang, W.R. Kam [et al.] // mBio. – 2012. – Vol. 3, № 6. – P. e00401-12.
155. Kanungo, S. Cholera / S. Kanungo, A.S. Azman, Th. Ramamurthy [et al.] // Lancet. – 2022. – Vol. 399, № 10333. – P. 1429-1440.
156. Kaper, J.B. Cholera / J.B. Kaper, J.G. Morris Jr, M.M. Levine // Clin. Microbiol. Rev. – 1995. – Vol. 8, № 1. – P. 48-86.
157. Kenworthy, A.K. Cholera toxin as a probe for membrane biology / A.K. Kenworthy, S.S. Schmieder, K. Raghunathan [et al.] // Toxins (Basel). – 2021. – Vol. 13, № 8. – P. 543.
158. Kumar, V. Carbohydrate inhibitors of cholera toxin / V. Kumar, W.B. Turnbull // Beilstein J. Org. Chem. – 2018. – Vol. 14. – P. 484-498.
159. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.

160. Lei, D. Removal of the innocuity test from The International Pharmacopoeia and WHO recommendations for vaccines and biological products / D. Lei, H. Schmidt, I. Knezevic [et al.] // *Biologicals*. – 2020. – № 66. – P. 17-20.
161. Lencer, W.I. The intracellular voyage of cholera toxin: Going retro / W.I. Lencer, B. Tsai // *Trends Biochem. Sci.* – 2003. – Vol. 28, № 12. – P. 639-645.
162. Leung, D.T. Immune responses to cholera in children / D.T. Leung, F. Chowdhury, S.B. Calderwood [et al.] // *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* – 2012. – Vol. 10, № 4. – P. 435-444.
163. Levine, M.M. PaxVax CVD 103-HgR single-dose live oral cholera vaccine / M.M. Levine, W.H. Chen, J.B. Kaper [et al.] // *Expert Rev. Vaccines*. – 2017. – Vol. 16, № 3. – P. 197-213.
164. Li, H. Crystal structure of the outer membrane protein OmpU from *Vibrio cholerae* at 2.2 Å resolution / H. Li, W. Zhang, Ch. Dong // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* – 2018. – Vol. 74, Pt. 1. – P. 21-29.
165. Li, X. Structure elucidation and gene cluster characterization of the O-antigen of *Vibrio cholerae* O68 containing (2S,4R)-2,4-dihydroxypentanoic acid / X. Li, A.V. Perepelov, A.V. Filatov [et al.] // *Carbohydr. Res.* – 2019. – Vol. 484. – P. 107766.
166. Li, Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens / Y. Li, P. Fan, Sh. Zhou [et al.] // *Microb. Pathog.* – 2017. – Vol. 107. – P. 54-61.
167. Lippi, D. Cholera / D. Lippi, E. Gotuzzo, S. Caini // *Microbiol. Spectr.* – 2016. – Vol. 4, № 4. – P. 173–180.
168. Lopez, A.L. Killed oral cholera vaccines: history, development and implementation challenges / A.L. Lopez, M.L. Gonzales, J. G. Aldaba [et al.] // *Ther Adv Vaccines*. – 2014. – Vol. 2, № 5. – P. 123-136.
169. Lowry, O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent / O.H. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265-275.

170. Luna, E. Influences of *Vibrio cholerae* lipid A types on LPS bilayer properties / E. Luna, S. Kim, Y. Gao [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2021. – Vol. 125, № 8. – P. 2105-2112.
171. Lutz, C. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae* / C. Lutz, M. Erken, P. Noorian [et al.] // Front. Microbiol. – 2013. – Vol. 4. – P. 375.
172. Mattia, F. D. The consistency approach for quality control of vaccines - A strategy to improve quality control and implement 3Rs / F. D. Mattia, J.-M. Chapsal, J. Descamps [et al.] // Biologicals. – 2011. – № 39. – P. 59-65.
173. Matias, W.R. Laboratory evaluation of immunochromatographic rapid diagnostic tests for cholera in Haiti / W.R. Matias, F.E. Julceus, C. Abelard [et al.] // PLOS ONE. – 2017. – Vol. 12, № 11. – P. e0186710.
174. Mekalanos, J.J. Purification of cholera toxin and its subunits: new methods of preparation and the use of hypertoxinogenic mutants / J.J. Mekalanos, R.J. Collier, W.R. Romig // Infect. Immun. – 1978. – Vol. 20, № 2. – P. 552–558.
175. Miyoshi, Sh-I. Extracellular proteolytic enzymes produced by human-pathogenic *Vibrio* species / S. Miyoshi // Front. Microbiol. – 2013. – Vol. 4. – P. 339.
176. Mogasale, V. Economic burden of cholera in Asia / V. Mogasale, V.V. Mogasale, A. Hsiao // Vaccine. – 2020. – Vol. 38, suppl. 1. – P. A160-A166.
177. Mukherjee, A. *Vibrio cholerae* hemolysin: The β -trefoil domain is required for folding to the native conformation / A. Mukherjee, S. Ganguly, N.S. Chatterjee [et al.] // Biochem. Biophys. Rep. – 2016. – Vol. 8. – P. 242-248.
178. Mukherjee, M.M. Towards the complete Synthetic O-Antigen of *Vibrio cholerae* O1, serotype Inaba: improved synthesis of the conjugation-ready upstream terminal hexasaccharide determinant / M.M. Mukherjee, P. Xu, E.D. Stevens [et al.] // RSC Adv. – 2019. – Vol. 9, № 62. – P. 36440-36454.
179. Odevall, L. The Euvichol story – Development and licensure of a safe, effective and affordable oral cholera vaccine through global public private partner-

ships / L. Odevall, D. Hong, L. Digilio [et al.] // *Vaccine*. – 2018. – Vol. 36, № 45. – P. 6606-6614.

180. Odevall, L. Consensus meeting on international standards for oral whole cell killed cholera vaccines / L. Odevall, S. Rijpkema, D. Smith [et al.] // *Vaccin Res.* – 2019. – Vol. 1, № 1. – P. 72-78.

181. Okabe, L. On a method of the standardization of anti-diphtheria serum by the use of tissue cultivation / L. Okabe // *Kitasato Archive of experimental Medicine*. – 1933. – Vol. 10. – P. 41-56.

182. Orata, F.D. The 2010 cholera outbreak in Haiti: How science solved a controversy / F.D. Orata, P.S. Keim, Y. Boucher // *PLoS Pathog.* – 2014. – Vol. 10, № 4. – P. e1003967.

183. Ouchterlony, O. Antigen antibody reactions in gels / O. Ouchterlony // *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* – 1949. – Vol. 26, № 4. – P. 507-515.

184. Parker, L.A. Adapting to the global shortage of cholera vaccines: targeted single dose cholera vaccine in response to an outbreak in South Sudan / L.A. Parker, J. Rumunu, Chr. Jamet [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* – 2017. – Vol. 17, № 4. – P. e123-e127.

185. Pezzoli, L. Global oral cholera vaccine use, 2013–2018 / L. Pezzoli, on behalf of the Oral Cholera Vaccine Working Group of the Global Task Force on Cholera Control // *Vaccine*. – 2020. – Vol. 38, suppl. 1. – P. A132-A140.

186. Piarroux, R. Cholera / R. Piarroux, St.Rebaudet // *Rev. Prat.* – 2017. – Vol. 67, № 10. – P. 1117–1121.

187. Piarroux, R. Cholera epidemics in 2010: Respective roles of environment, strain changes, and human-driven dissemination / R. Piarroux, B. Faucher // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Vol. 18, № 3. – P. 231-238.

188. Pressler, K. Characterization of *Vibrio cholerae's* extracellular nuclease Xds / K. Pressler, F. Mitterer, D. Vorkapic [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 2057.

189. Rabaan, A.A. Cholera: an overview with reference to the Yemen epidemic / A.A. Rabaan // *Front. Med.* – 2019. – Vol. 13, № 2. – P. 213-228.

190. Reidl, J. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host / J. Reidl, K.E. Klose // FEMS Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 26, № 2. – P. 125-139.
191. Royal, J.M. Therapeutic potential of cholera toxin B subunit for the treatment of inflammatory diseases of the mucosa / J.M. Royal, N. Matoba // Toxins (Basel). – 2017. – Vol. 9, № 12. – P. 379.
192. Russell, W.M.S. The principles of humane experimental technique / W.M.S. Russell, R.L. Burch London: Methuen; 1959. P. 238.
193. Sack, D.A. Getting serious about cholera / D.A. Sack, R.B. Sack, C.L. Chaignat // N. Engl. J. Med. – 2006. – Vol. 355, № 7. – P. 649-651.
194. Safa, A. Cholera toxin phage: structural and functional diversity between *Vibrio cholerae* biotypes / A. Safa, J.S. Jime, F. Shahel // AIMS Microbiol. – 2020. – Vol. 6, № 2. – P. 144-151.
195. Saluja, T. An overview of VaxchoraTM, a live attenuated oral cholera vaccine / T. Saluja, V.V. Mogasale, J.L. Excler [et al.] // Human vaccines & immunotherapeutics. – 2020. – Vol. 16, № 1. – P. 42-50.
196. Sanchez, J. Cholera toxin – A foe & A friend / J. Sanchez, J. Holmgren // Indian J. Med. Res. – 2011. – Vol. 133, № 2. – P. 153-163.
197. Sanchez, J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects / J. Sanchez, J. Holmgren // Cell Mol. Life Sci. – 2008. – Vol. 65, № 9. – P. 1347-1360.
198. Saslowsky, D.E. Ganglioside GM1-mediated transcytosis of cholera toxin bypasses the retrograde pathway and depends on the structure of the ceramide domain / D.E. Saslowsky, Y.M. te Welscher, D.J.F. Chinnapen [et al.] // J. Biol. Chem. – 2013. – Vol. 288, № 36. – P. 25804-25809.
199. Schaetti, Chr. Costs of illness due to cholera, costs of immunization and cost-effectiveness of an oral cholera mass vaccination campaign in Zanzibar / Chr. Schaetti, M.G. Weiss, S.M. Ali [et al.] // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2012. – Vol. 6, № 10. – P. e1844.

200. Seed, K.D. Phase variable O antigen biosynthetic genes control expression of the major protective antigen and bacteriophage receptor in *Vibrio cholerae* O1 / K.D. Seed, Sh.M. Faruque, J.J. Mekalanos [et al.] // PLoS Pathog. – 2012. – Vol. 8, № 9. – P. e1002917.
201. Seper, A. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation / A. Seper, V.H. Fengler, S. Roier [et al.] // Mol. Microbiol. – 2011. – Vol. 82, № 4. – P. 1015–1037.
202. Seper, A. *Vibrio cholerae* evades neutrophil extracellular traps by the activity of two extracellular nucleases / A. Seper, A. Hosseinzadeh, G. Gorkiewicz [et al.] // PLoS Pathog. – 2013. – Vol. 9, № 9. – P. e1003614.
203. Shaikh, H. Current and future cholera vaccines / H. Shaikh, J. Lynch, J. Kim [et al.] // Vaccine. – 2020. – Vol. 38, suppl. 1. – P. A118-A126.
204. Shi, M. The 58th cysteine of TcpP is Essential for *Vibrio cholerae* virulence factor production and pathogenesis / M. Shi, N. Li, Y. Xue [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 118.
205. Shinoda, S. Protease produced by *Vibrio* / S. Shinoda, Sh-I. Miyoshi // Biocontrol Science. – 2011. – Vol. 16, № 1. – P. 1-11.
206. Sikora, A.E. Proteomic analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretome reveals new proteins, including three related serine proteases / A.E. Sikora, R.A. Zielke, D.A. Lawrence [et al.] // J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286, № 19. – P. 16555-16566.
207. Somboonwit, Ch. Current views and challenges on clinical cholera / Ch. Somboonwit, L.J. Menezes, D.A. Holt [et al.] // Bioinformatics. – 2017. – Vol. 13, № 12. – P. 405-409.
208. Svennerholm, A.M. Rapid GM1-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin / A.M. Svennerholm, G. Wiklund // J. Clin. Microbiol. – 1983. – Vol. 17, № 4. – P. 596-600.
209. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin,

T. Staehelin, J. Gordon // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76, № 9. – P. 4350-4354.

210. Tsui, J.H. Microfluidics-assisted *in vitro* drug screening and carrier production / J.H. Tsui, W. Lee, S.H. Pun [et al.] // Adv Drug Deliv Rev. – 2013. – Vol. 65, № 11. – P. 1575-1588.

211. The International Pharmacopoeia. 11 th ed. – WHO, 2020.

212. Viviani, L. Global harmonization of vaccine testing requirements: Making elimination of the ATT and TABST a concrete global achievement / L. Viviani, M. Halder, M. Gruber [et al.] // Biologicals. – 2020. – № 63. – P. 101-105.

213. Walum, E. Cell toxicology a new paradigm / E. Walum, B. Ekwall // ALTA. – 2000. – Vol. 28. – P. 159.

214. Weber, G.G. The complexity of ToxT-dependent transcription in *Vibrio cholerae* / G.G. Weber, K.E. Klose // Indian J. Med. Res. – 2011. – Vol. 133, № 2. – P. 201-206.

215. Weil, A.A. Cholera: recent updates / A.A. Weil, E.T. Ryan // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2018. – Vol. 31, № 5. – P. 455-461.

216. Wernick, N.L.B. Cholera Toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum / N.L.B. Wernick, D.J.F. Chinnapen, J.A. Cho [et al.] // Toxins. – 2010. – Vol. 2, № 3. – P. 310-325.

217. Whitfield, C. Lipopolysaccharide O-antigens-bacterial glycans made to measure / C. Whitfield, D.M. Williams, S.D. Kelly // J. Biol. Chem. – 2020. – Vol. 295, № 31. – P. 10593-10609.

218. Wierzba, Th.F. Oral cholera vaccines and their impact on the global burden of disease / Th.F. Wierzba // Hum. Vaccin. Immunother. – 2019. – Vol. 15, № 6. – P. 1294-1301.

219. World Health Organization. Guidelines for the production and control of inactivated oral cholera vaccines. WHO, 2004. – № 924 – P. 129-149.

220. WHO [Electronic resource]. URL: <https://www.who.int/ru/news/item/19-10-2022-shortage-of-cholera-vaccines-leads->

to-temporary-suspension-of-two-dose-strategy--as-cases-rise-worldwide (дата обращения 30.03.2023).

221. WHO [Electronic resource]. URL: <https://www.who.int/ru/news/item/03-10-2017-partners-commit-to-reduce-cholera-deaths-by-90-by-2030> (дата обращения 30.03.2023)].

222. WHO [Electronic resource]. URL: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437> (дата обращения 30.03.2023).

223. WHO Technical Report Series No. 927. WHO Expert Committee On Biological Standardization (54th report). Geneva, 2005. [Electronic resource]. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9241209275> (дата обращения 26.12.2022).

224. World Health Organization. Cholera vaccine: WHO position paper, August 2017 – Recommendations / World Health Organization // Vaccine. – 2018. – Vol. 36, № 24. – P. 3418-3420.

225. World Health Organization. Cholera. Weekly Epidemiological Record. – Geneva: WHO, 2010. – Vol. 86, № 31. – P. 325-338.

226. World Health Organization. Cholera. Weekly Epidemiological Record. – Geneva: WHO, 2010. – Vol. 85, № 13. – P. 117-128.

227. World Health Organization. Cholera. Weekly Epidemiological Record. – Geneva: WHO, 2017. – Vol. 93, № 38. – P. 489-496.

228. World Health Organization. Cholera. Weekly Epidemiological Record. – Geneva: WHO, 2018. – Vol. 94, № 48. – P. 561-568.

229. World Health Organization. Cholera. Weekly Epidemiological Record. – Geneva: WHO, 2019. – Vol. 95, № 37. – P. 441-448.

230. World Health Organization. Cholera. Weekly Epidemiological Record. – Geneva: WHO, 2020. – Vol. 96, № 37. – P. 445-454.

231. Yamasaki, E. Detection of cholera toxin by an immunochromatographic test strip / E. Yamasaki, R. Sakamoto, T. Matsumoto [et al.] // Methods Mol. Biol. – 2017. – Vol. 1600. – P. 1-7.

232. Yamasaki, E. Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin / E. Yamasaki, R. Sakamoto, T. Matsumoto [et al.] // Biomed Res. Int. – 2013. – Vol. 2013. – P. 679038.

233. Yoon, S.H. *Vibrio cholerae* / S.H. Yoon, C.M. Waters // Trends Microbiol. – 2019. – Vol. 27, № 9. – P. 806-807.

234. Zhang, R. The three-dimensional crystal structure of cholera toxin / R. Zhang, D. Scott, M. Westbrook [et al.] // J. Mol. Biol. – 1995. – Vol. 251, № 4. – P. 563-573.

235. Zuilhof, H. Fighting Cholera one-on-one: The Development and efficacy of multivalent cholera-toxin-binding molecules / H. Zuilhof // Acc. Chem. Res. – 2016. – Vol. 49, № 2. – P. 274-285.



УТВЕРЖДАЮ
Директор ФКУН Российский
противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора,
академик РАН, д.м.н., профессор
Кутырев В.В.
«14» июня 2023 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научных исследований, полученных в ходе выполнения диссертационной работы Дураковой Оксаны Сергеевны на тему «Совершенствование методических подходов для оценки специфической активности антигенов холерной химической вакцины» для проведения научных исследований по совершенствованию производства холерной химической вакцины

Наименование предложений для внедрения:

1. Методические рекомендации «Применение ДОТ-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины»
2. Методические рекомендации «Использование культуры клеток для анализа активности холерного токсина на этапах производства компонентов холерной химической вакцины»
3. Методические рекомендации «Определение специфической активности компонентов холерной вакцины с использованием культуры клеток»

Кем предложено, адрес исполнителя: Дураковой О.С., лаборатория холерных вакцин Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Саратов.

Где и когда внедрено: в лаборатории холерных вакцин, в отделе биологического и технологического контроля Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Саратов, ул. Университетская 46, июнь 2023 г.

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ 1

Замечания, предложения:

1. Указанные в методических рекомендациях «Применение ДОТ-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины» приемы могут быть применены при определении специфической активности антигенов как при культивировании холерного вибриона, так и их активности в готовой лекарственной форме. Методические рекомендации предназначены для специалистов-биотехнологов, занимающихся производством, а также специалистов научных лабораторий медицинского профиля, работающих в области профилактики холеры.

2. Указанные в методических рекомендациях «Использование культуры клеток для анализа активности холерного токсина на этапах производства компонентов холерной химической вакцины» приемы могут быть применены для выявления холерного токсина и последующего определения его активности при глубинном культивировании производственного штамма *Vibrio cholerae* 569В в биореакторе. Предложенный способ основан на использовании культуры овариальных клеток китайского хомячка (СНО-К1), специфически выявляющей присутствие токсина. Методические рекомендации предназначены для специалистов, работающих в области производства иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), занимающихся разработкой и совершенствованием технологии производства ИЛП, а также сотрудникам научно-исследовательских подразделений, использующих в работе перевиваемые клеточные культуры.

3. Указанные в методических рекомендациях «Определение специфической активности компонентов холерной вакцины с использованием культуры клеток» приемы могут быть применены при определении антигенной активности специфической фракции холерогена-анатоксина по анатоксинасвязыванию при производстве холерной химической вакцины. Предложенный способ основан на использовании культуры овариальных клеток китайского хомячка (СНО-К1). Методические рекомендации предназначены для специалистов, работающих в области производства иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), занимающихся разработкой и совершенствованием технологии производства ИЛП, а также сотрудникам научно-исследовательских подразделений, использующих в работе перевиваемые клеточные культуры.

Ответственные за внедрение:

Заведующая отделом
профилактических препаратов, к.б.н.



Волох О.А.

Заведующая отделом биологического
и технологического контроля, к.б.н.



Лобовикова О.А.



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(19) **RU** (11) **2 799 574** (13) **C1**

(51) МПК

*A61K 39/00 (2006.01)**A61K 39/106 (2006.01)**A61K 39/02 (2006.01)**C12P 21/00 (2006.01)*

(52) СПК

*A61K 39/107 (2023.05)**A61K 39/02 (2023.05)**C12P 21/00 (2023.05)*

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 06.07.2023)

(21)(22) Заявка: **2022127498**, **21.10.2022**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.10.2022Дата регистрации:
06.07.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **21.10.2022**(45) Опубликовано: **06.07.2023** Бюл. № **19**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2535122 C1, 10.12.2014. US 20090304733 A1, 10.12.2009. Алексеева Л.П. Современные методические приемы очистки холерного токсина / Л.П. Алексеева, О.А. Якушева, В.П. Зюзина [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. - 2019. - Т. 15. - N1. - С. 5-10. Jang, H. Improved purification process for cholera

toxin and its application to the quantification of residual toxin in cholera vaccines / H. Jang, H.S. Kim, J.A. Kim [et al.] / J. Microbiol Biotechnol. - 2009. - V. 19, N1. - P. 108 - 112.

Адрес для переписки:

410005, г. Саратов, ул. Университетская,
46, ФКУН Российский противочумный
институт "Микроб"

(72) Автор(ы):

Громова Ольга Викторовна (RU),
Киреев Михаил Николаевич (RU),
Дуракова Оксана Сергеевна (RU),
Ливанова Людмила Федоровна (RU),
Гаева Анна Вячеславовна (RU),
Воробьева Светлана Александровна (RU),
Волох Оксана Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное казенное учреждение 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) (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинской биотехнологии. Описан способ получения холерного токсина для контроля производства холерной химической вакцины, включающий глубинное культивирование штаммов-продуцентов, стерилизующую фильтрацию культуральной жидкости, осаждение белковой фракции. Способ отличается от аналогов тем, что холерный токсин выделяют последовательным применением тангенциальной ультрафильтрации для удаления примесей с молекулярной массой выше 100 кДа и концентрирования полученного фильтрата с дополнительной адсорбирующей фильтрацией через двуслойный фильтр с положительным зарядом и колоночной гель-хроматографией. Технический результат заключается в упрощении технологии получения препарата ХТ с сохранением его иммунохимических свойств. 4 ил., 1 табл., 2 пр.

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. Ду-**

ракова, 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 МММСП (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. Лива-

нова, О.Д. Клокова, Н.А. Шарапова, О.А. Волох // 22-ая Междунар. Пущинская 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. Пущинская 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 бивалентной 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.