

# Разработка способа получения поликлональных сывороток к О-антигенам *Vibrio cholerae* классического биовара сероваров Инаба и Огава

С.А.Воробьева, О.В.Громова, М.Н.Киреев, О.А.Волох

ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация

Одним из важных этапов производства иммунобиологического лекарственного препарата «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой» является контроль специфических компонентов по их активности. На сегодняшний день отсутствуют коммерческие наборы для определения содержания серовароспецифичного О-антигена Инаба и Огава холерного вибриона в компонентах и готовой лекарственной форме вакцины. Перспективными представляются иммунохимические методы, основой которых являются специфические гипериммунные сыворотки животных. В работе представлены схемы иммунизации кроликов для получения поликлональных сывороток к О-антигенам *Vibrio cholerae* сероваров Огава и Инаба классического биовара. Применение хитозана в качестве адъюванта позволило получить гипериммунную сыворотку к О-антигену Инаба со следующими характеристиками: рабочее разведение –1/10, активность с гомологичным О-антигеном –1/1600, активность с гетерологичным О-антигеном –1/80. Использование схемы с внутривенной иммунизацией без использования адъюванта привело к получению активной сыворотки к О-антигену Огава, рабочее разведение –1/50, активность с гомологичным О-антигеном –1/1280, активность с гетерологичным О-антигеном –1/40. Показана возможность определения О-антигенов в готовом препарате вакцины методом дот-иммуноанализа с золотыми наночастицами с использованием полученных экспериментальных сывороток.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, кроличьи сыворотки, адъюванты, холерная вакцина, глюкановые частицы, хитозановые частицы

**Для цитирования:** Воробьева С.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Волох О.А. Разработка способа получения поликлональных сывороток к О-антигенам *Vibrio cholerae* классического биовара сероваров Инаба и Огава. Бактериология. 2024; 9(2): 35–39. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-35-39

## Development of a method for obtaining polyclonal serums for *Vibrio cholerae* O-antigens of the classic biotype serotype Inaba and Ogawa

S.A.Vorobeva, O.V.Gromova, M.N.Kireev, O.A.Volokh

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

One of the important stages of the production of the immunobiological drug "Cholera bivalent chemical vaccine, tablets coated with an intestinal shell" is the control of specific components according to their activity. To date, there are no commercial kits for determining the content of serovarospecific O-antigen Inaba and Ogawa cholera vibrio in the components and finished dosage form of the vaccine. Immunochemical methods based on specific hyperimmune sera of animals are promising. The paper presents the schemes of immunization of rabbits for obtaining polyclonal serums to *Vibrio cholerae* O-antigens of Ogawa and Inaba serovars of the classical biovar. The use of chitosan as an adjuvant made it possible to obtain a hyperimmune serum to the Inaba O-antigen with the following characteristics: working dilution –1/10, activity with homologous O-antigen –1/1600, activity with heterologous O-antigen –1/80. The use of a scheme with intravenous immunization without the use of an adjuvant led to the production of an active serum for Ogawa O-antigen, working dilution –1/50, activity with homologous O-antigen –1/1280, activity with heterologous O-antigen –1/40. The possibility of determining O-antigens in the finished vaccine preparation by dot-immunoassay with gold nanoparticles using the obtained experimental serums is shown.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, rabbit serums, adjuvants, cholera vaccine, glucan particles, chitosan particles

**For citation:** Vorobeva S.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Volokh O.A. Development of a method for obtaining polyclonal serums for *Vibrio cholerae* O-antigens of the classic biotype serotype Inaba and Ogawa. Bacteriology. 2024; 9(2): 35–39. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-35-39

### Для корреспонденции:

Воробьева Светлана Александровна, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Телефон: (8452) 26-2131

E-mail: rusrap@microbe.ru

Статья поступила 13.11.2023, принята к печати 28.06.2024

### For correspondence:

Svetlana A. Vorobeva, Junior Researcher, laboratory of cholera vaccine, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation

Phone: (8452) 26-2131

E-mail: rusrap@microbe.ru

The article was received 13.11.2023, accepted for publication 28.06.2024

**И**ммунобиологический лекарственный препарат «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой» является единственным зарегистрированным и выпускаемым в России средством для профилактики холеры. Производство вакцины требует постоянного контроля специфических свойств как готовой лекарственной формы, так и компонентов на всех технологических стадиях, который проводится согласно Государственной Фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ, XV издание) и требованиям «Правил надлежащей производственной практики», утвержденным приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 4.06.2013 №916 (ред. от 18.12.2015), положения которого гармонизированы с руководством Good manufacturing practice (GMP).

Производственный цикл получения вакцины включает в себя контроль активности антигенных компонентов на всех этапах. В состав вакцины входят О-антигены (О-АГ) Инаба и Огава холерного вибриона, которые в настоящее время контролируются в реакции диффузионной преципитации и реакции непрямой гемагглютинации с «Сывороткой диагностической холерной О1 адсорбированной сухой для реакции агглютинации». Данные методы позволяют определять содержание только общего О-АГ без определения серовароспецифичности этого компонента.

Разработка практических методов оценки активности протективных антигенов холерного вибриона при производстве холерной бивалентной химической вакцины остается актуальным направлением. Ранее В.А.Фёдоровой с соавт., Н.А.Сыровой с соавт. были показаны преимущества применения вариантов твердофазного иммуноферментного анализа и дот-иммуноанализа (ДИА) для контроля биосинтеза антигенов на этапах производства [1, 2]. О.С.Дураковой с соавт. проведены исследования, по результатам которых предлагается использование непрямого ДИА с золотыми наночастицами (ЗНЧ) для оценки специфической активности антигенов холерного вибриона в процессе производства [3], в т.ч. для определения О-АГ [4]. Актуальной является разработка способа оценки содержания О-АГ Инаба и О-АГ Огава в готовой лекарственной форме методом прямого ДИА ЗНЧ.

Основой представленных иммунохимических методов являются специфические гипериммунные сыворотки животных. Согласно источникам литературы, для получения сывороток предпочтительнее использовать кроликов, поскольку антиген-связывающие центры в их сывороточных антителах соответствуют группировкам из 2–6 простых сахаров в молекуле О-АГ. Вероятность встречаемости именно таких сочетаний в О-антигенах других бактерий невелика, иммунные сыворотки кроликов содержат меньшее количество гетерогенных антител и дают соответственно меньше перекрестных реакций [5].

Использование в качестве иммуногена очищенных антигенов вместо цельноклеточного корпускулярного позволяет повысить специфичность сывороток, а применение адъювантов – их активность. Опубликованы работы, в которых ЗНЧ были использованы для получения антител к целому ряду гаптенных и полноценных антигенов [6, 7]. Л.А.Дыкманом с соавт. были синтезированы конъюгаты ЗНЧ с антигенами *Vibrio cholerae*, которые были использованы для иммунизации кроликов с целью получения гипериммунных сывороток [8].

В настоящее время набирают популярность адъюванты на основе углеводов. В литературных источниках отмечаются их исключительные свойства, такие как низкая токсичность, биосовместимость, способность к биологическому разложению, низкая стоимость [9, 10]. В последнее время активно используются адъюванты на основе хитозана (Cs) и глюкановых частиц (GPs) [11–14]. Известно, что хитозан усиливает как гуморальные, так и клеточно-опосредованные иммунные реакции при вакцинации. При сравнении с традиционными адъювантами доказано, что его действие эквивалентно неполному адъюванту Фрейнда (НАФ) и превосходит гидроксид алюминия. Глюкановые частицы представляют собой очищенные клеточные стенки *Saccharomyces cerevisiae* и могут применяться в качестве системы доставки антигенов [12, 13].

В связи с вышеизложенным нами была поставлена цель – разработка способа получения поликлональных сывороток к О-антигенам *Vibrio cholerae* классического биовара сероваров Инаба и Огава.

## Материалы и методы

В качестве антигенных препаратов использовали О-АГ Инаба и О-АГ Огава –компоненты холерной химической вакцины. Получение препаратов О-АГ проводили в соответствии с нормативно-технической документацией на производство «Вакцины холерной бивалентной химической, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой», в качестве штаммов-продуцентов использовали производственные штаммы *V. cholerae* О1 классического биовара 569В серовара Инаба и *V. cholerae* М-41 серовара Огава, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Для иммунизации использовали лиофилизированные препараты О-АГ Инаба и О-АГ Огава в концентрации (по весу), соответствующей схеме иммунизации, разводящая жидкость – 0,9%-й раствор натрия хлорида.

Для получения иммунных сывороток использовали кроликов породы шиншилла, весом  $2,7 \pm 0,3$  кг. Животные содержались в виварии на стандартных условиях питания. Тотальное кровопускание иммунных животных проводили после эвтаназии инъекционными препаратами, обладающими анальгезирующим и миорелаксационным действием. Все работы проводили в соответствии с протоколом исследования, утвержденным комиссией по биоэтике ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

В качестве адъювантов использовали глюкановые и хитозановые частицы, НАФ.

## Получение глюкановых частиц

GPs были получены из клеток пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*) с помощью серии стадий щелочной и кислотной экстракции [15]. В течение 4 ч выращивали *S. cerevisiae* в среде на основе физиологического раствора и 6%-го раствора сахарозы при 28°C. Затем отделяли биомассу центрифугированием в течение 20 мин при 3000 об./мин, однократно промывали осадок дистиллированной водой, суспендировали в 1 М NaOH и нагревали при 90°C в течение 1 ч. Затем центрифугирование и экстракцию горячей щелочью повторяли.

Экстрагированные щелочью частицы центрифугировали в течение 15 мин при 5000 об./мин, суспендировали в дистиллированной воде (рН = 4,5) и нагревали при 75°C в течение 1 ч с последующей последовательной промывкой частиц дистиллированной водой (3 раза), изопропанолом (4 раза) и ацетоном (2 раза). GPs высушивали на воздухе и хранили при 4°C.

#### Конъюгат GPs с О-антигеном

Для получения конъюгата к 10 мг GPs добавляли 100 мкл раствора О-АГ в концентрации, равной двукратной иммунизирующей дозе, оставляли набухать при 4°C в течение 1 ч. Затем замораживали при -20°C и лиофилизировали, после чего трехкратно отмывали стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида. Суспендировали в 1 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида и использовали для иммунизации. Эффективность связывания О-АГ с GPs оценивали измерением концентрации углеводов фенол-сернокислотным методом [16].

#### Получение хитозановых частиц

Для приготовления Cs использовали 0,25%-й раствор хитозана с молекулярной массой 200 кДа (степень деацетилирования 75–95%), приготовленный в 2%-м растворе уксусной кислоты, содержащем 1% твин-80. Затем 3,5 мл 10%-го раствора сульфата натрия добавляли к 200 мл раствора хитозана со скоростью 1 мл/мин при умеренном перемешивании (<50 об./мин) на магнитной мешалке в течение 60 мин при комнатной температуре [9]. Полученную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об./мин. Осадок дважды промывали в деионизированной воде. Затем проводили стерилизацию в 70%-м этиловом спирте 30 мин, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в стерильном 0,9%-м растворе натрия хлорида. Полученный раствор хитозановых частиц хранили при 4°C.

#### Конъюгат Cs с О-антигеном

Конъюгат получали методом адсорбции антигена на растворимой форме подготовленных частиц хитозана. Раствор Cs (OD 220 нм = 1,0) соединяли с раствором О-АГ в двукратной иммунизирующей дозе в пропорции 1:1 по объему. Инкубировали 45 ± 15 мин с постоянным перемешиванием.

Эффективность связывания О-АГ с частицами хитозана определяли измерением концентрации углеводов фенол-сернокислотным методом [16] в супернатанте после центрифугирования раствора при 5000 об./мин в течение 20 мин. Полученный конъюгат Cs с О-АГ использовали для иммунизации, если степень связывания составляла не менее 85%.

Иммунизирующие препараты с НАФ готовили *ex tempore* путем смешивания в объемном соотношении 1:1 адьюванта и раствора О-АГ.

Активность экспериментальных гипериммунных сывороток оценивали в реакции диффузионной преципитации (РДП) и методом непрямого ДИА ЗНЧ [3].

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по стандартной методике определения грубых ошибок, рассчитывая среднее арифметическое значение ( $M$ ), среднее квадратичное отклонение ( $sx$ ) и стандартную ошибку среднего ( $mM$ ) с помощью программы Microsoft Office Excel. При оценке достоверного коэффициента исходили в каждом случае из степени числа свобод выбранной нами точности 95%.

## Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе работы нами было оценено токсическое действие хитозановых и глюкановых частиц, используемых в качестве адьювантов, по показателю «аномальная токсичность» (ГФ РФ, ОФС.1.2.4.0004.15). Растворы Cs и GPs вводили беспородным белым мышам (19 ± 1 г) внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. На каждый адьювант приходилась группа из 5 животных. В период наблюдения (в течение 7 суток) не отмечалось изменения общего состояния по их двигательной активности, потреблению корма и воды, состоянию шерсти и слизистых оболочек, массе тела.

В ходе исследования применяли 5 схем иммунизации для О-АГ Инаба и О-АГ Огава. В качестве контрольной была выбрана подкожная двухцикловая иммунизация с НАФ. Первые 3 иммунизации проводились с недельными интервалами возрастающими дозами (100, 200 и 400 мкг) О-АГ, затем две дозы (по 500 мкг) с интервалом 3 нед. [17].

*Экспериментальные схемы иммунизации.* Схемы 1 и 2 состояли из 2 циклов по 3 внутривенные инъекции, с интервалами между введением антигена 4 суток в возрастающих дозах (0,5; 1; 2 мг и 1; 2; 4 мг соответственно). Второй цикл начинали после 14-дневного перерыва (1; 2; 4 мг и 2; 4; 8 мг для схемы 1 и 2).

Схемы 3 и 4 состояли из 2 циклов иммунизации по 3 инъекции в дозах 2; 4; 4 мг: 1-й цикл – способ введения антигена подкожный с использованием GPs или Cs в качестве адьюванта, 2-й цикл – внутривенное введение иммуногена без применения адьюванта. Интервал между циклами составлял 30 суток.

Через 7 суток после последней инъекции каждого цикла проводили пробное кровопускание с целью определения уровня иммунного ответа животного-продуцента. Оценивали специфическую активность сывороток в реакции диффузионной преципитации с гомологичными антигенами. В случае, если после 2-го цикла иммунизации активность сывороток была низкой, дополнительно внутривенно вводили 2–8 мг антигена. Тотальное кровопускание проводили на 8–10-е сутки после последней инъекции.

Нами были получены по 5 сывороток к каждому О-АГ и определена их активность и специфичность в РДП и ДИА ЗНЧ. В качестве контрольной схемы сравнения использовали протокол иммунизации, представленный в литературе [16], следуя которому была получена кроличья сыворотка к липополисахариду *V. cholerae* O1 серогруппы.

Нами установлена активность всех полученных гипериммунных сывороток, однако регистрировалось наличие перекрестных реакций с гетерологичным О-АГ. Показатели активности в ДИА ЗНЧ представлены на рис. 1, 2.

Применение разработанных схем иммунизации кроликов позволяет получить специфические поликлональные кроличьи сыворотки к О-АГ холерного вибриона. Нами были отобраны сыворотки с наибольшей активностью и специфичностью. Иммунизация О-АГ Инаба по схеме №4 позволила получить сыворотку со следующими параметрами (в ДИА ЗНЧ): активность с гомологичным О-АГ –1/1600, активность с гетерологичным О-АГ –1/80. Необходимо отметить, что применение частиц хитозана в качестве адьюванта при подкожном введении вызывали образование небольших грану-

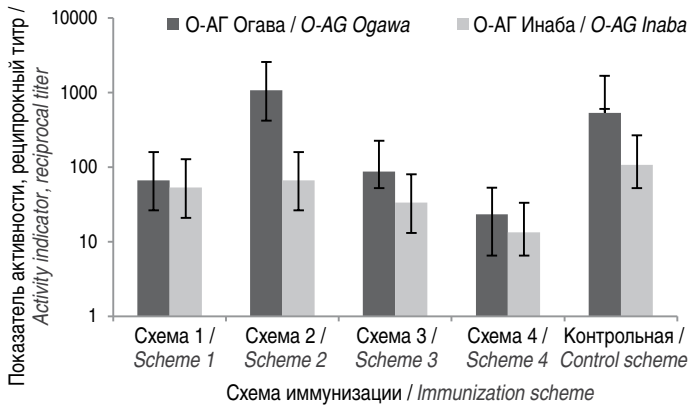


Рис. 1. Измерение активности кроличьих сывороток, полученных к О-АГ *Vibrio cholerae* серовара Огава, методом ДИА ЗНЧ ( $n = 3$ ).  
 Fig. 1. Measurement of the activity of rabbit sera obtained for O-AG *Vibrio cholerae* by serovar Ogawa, by the method of dot-immunoassay with gold nanoparticles ( $n = 3$ ).

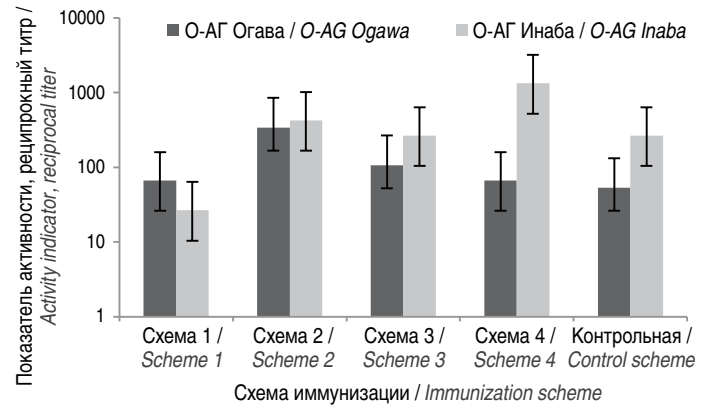


Рис. 2. Измерение активности кроличьих сывороток, полученных к О-АГ *Vibrio cholerae* серовара Инаба, методом ДИА ЗНЧ ( $n = 3$ ).  
 Fig. 2. Measurement of the activity of rabbit sera obtained for O-AG *Vibrio cholerae* serovar Inaba, by the method of dot-immunoassay with gold nanoparticles ( $n = 3$ ).

№ образца / No. sample	Сыворотка диагностическая холерная О1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации / Diagnostic cholera serum O1 adsorbed dry for agglutination reaction (RA)	Экспериментальная сыворотка кроличья к О-АГ Огава / Experimental rabbit serum to O-AG Ogawa	Экспериментальная сыворотка кроличья к О-АГ Инаба / Experimental rabbit serum to O-AG Inaba
1	4096	256	1024
2	4096	128	512
3	4096	128	1024
4	4096	256	2048
5	4096	128	512
6	4096	256	512
7	2048	128	256

лем, которые не оказывали сильного влияния на общее состояние животных.

Сыворотка к О-АГ Огава, полученная в соответствии со схемой №2, обладала следующими характеристиками: активность с гомологичным О-АГ –1/1280, активность с гетерологичным О-АГ –1/40.

Полученные поликлональные сыворотки были апробированы для определения О-АГ в 7 сериях готового препарата вакцины. Установлено рабочее разведение 1/10 для сыворотки к О-АГ Инаба и 1/50 для сыворотки к О-АГ Огава, которое позволяет достоверно определять содержание О-АГ Инаба и О-АГ Огава (таблица). Таким образом, нами были отобраны схемы иммунизации, позволяющие получать наиболее активные и специфичные поликлональные сыворотки, которые будут использованы для разработки способа оценки содержания О-АГ Инаба и О-АГ Огава на этапах производства вакцины холерной бивалентной химической.

#### Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

#### Financial support

No financial support has been provided for this work.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### Литература

1. Федорова ВА, Терешкина НЕ, Громова ОВ, Сырова НА, Девдариани ЗЛ, Ермаков НМ, и др. Новые методы контроля синтеза иммуногенов при производстве химической вакцины против холеры, вызванной *V. cholerae* O139. Биотехнология. 1999;2:82-88.
2. Сырова НА. Получение, характеристика и биотехнологические аспекты применения поли- и моноклональных антител к антигенам *Vibrio cholerae* O1 Инаба и Огава. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Саратов, 2005.
3. Дуракова ОС, Громова ОВ, Киреев МН, Воробьева СА, Клокова ОД, Ливанова ЛФ, и др. Применение дот-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2018;14(4):10-13.
4. Воробьева СА, Дуракова ОС, Волох ОА, Громова ОВ. Возможность определения специфической активности О-АГ в производстве холерной химической вакцины с помощью дот-анализа. Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2018;18(3):318-319. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319
5. Михайлова ВА. Разработка технологии получения кроличьей холерной агглютинирующей О-сыворотки. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Иркутск, 1998.
6. Киреев МН, Полунина ТА, Гусева НП, Подборонова НА, Краснов ЯМ, Тараненко ТМ. Изучение иммуногенных свойств антигена Ф1 чумного микроба, конъюгированного с наночастицами коллоидного золота и серебра. Проблемы особо опасных инфекций. 2008;2(96):43-45. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-2(96)-43-45
7. Староверов СА, Фомин АС, Габалов КП, Иващенко СВ, Маниесон ВЭ, Дыкман ЛА. Иммуностимулирующее действие наночастиц золота, конъюгиро-

- ванных с антигеном *Yersinia enterocolitica*. Инфекция и иммунитет. 2021;11(2):377-382. DOI: 10.15789/2220-7619-IEO-1405
8. Дыкман ЛА, Волох ОА, Громова ОВ, Дуракова ОС, Воробьева СА, Киреев МН, и др. Получение и характеристика антител к протективным антигенам холерного вибриона, конъюгированным с наночастицами золота. Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020;490(1):27-30. DOI: 10.31857/S2686738920010084
9. Bellich B, D'Agostino I, Semeraro S, Gamini A, Cesàro A. "The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans. Mar Drugs. 2016 May 17;14(5):99. DOI: 10.3390/md14050099
10. Paul P, Kolesinska B, Sujka W. Chitosan and Its Derivatives – Biomaterials with Diverse Biological Activity for Manifold Applications. Mini Rev Med Chem. 2019;19(9):737-750. DOI: 10.2174/1389557519666190112142735
11. Li X, Min M, Du N, Gu Y, Hode T, Naylor M, et al. Chitin, chitosan, and glycosylated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. Clin Dev Immunol. 2013;2013:387023. DOI: 10.1155/2013/387023
12. Soares E, Jesus S, Borges O. Chitosan:  $\beta$ -glucan particles as a new adjuvant for the hepatitis B antigen. Eur J Pharm Biopharm. 2018 Oct;131:33-43. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.07.018
13. Whelan AO, Flick-Smith HC, Homan J, Shen ZT, Carpenter Z, Khoshkenar P, et al. Protection induced by a *Francisella tularensis* subunit vaccine delivered by glucan particles. PLoS One. 2018 Oct 8;13(10):e0200213. DOI: 10.1371/journal.pone.0200213
14. Курашова СС, Дзагурова ТК, Ишмухаметов АА, Егорова МС, Баловнева МВ, Соцкова СЕ, и др. Адьюванты на основе углеводов для производства вакцин. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(2):81-91. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-2-81-91
15. Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Wang JP, Specht CA, Levitz SM. Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal  $\beta$ -glucans and toll-like receptor agonists. Infect Immun. 2009 May;77(5):1774-81. DOI: 10.1128/IAI.00086-09
16. Dubois M, Gilles KA, Hamilton J, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 1956;28:350-356.
17. Mukhopadhyay S, Nandi B, Ghose AC. Antibodies (IgG) to lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 mediate protection through inhibition of intestinal adherence and colonisation in a mouse model. FEMS Microbiol Lett. 2000 Apr 1;185(1):29-35. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09036.x
6. Kireev MN, Polunina TA, Guseva NP, Podboronova NA, Krasnov YaM, Taranenko TM. To study the immunogenic properties of the plague microbe F1 antigen conjugated with colloidal gold and silver nanoparticles. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2008;2(96):43-45. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-2(96)-43-45 (In Russian).
7. Staroverov SA, Fomin AS, Gabalov KP, Ivashchenko SV, Manieson VE, Dykman LA. Immunostimulating effect of gold nanoparticles conjugated with *Yersinia enterocolitica* antigen. Infection and immunity. 2021;11(2):377-382. DOI: 10.15789/2220-7619-IEO-1405 (In Russian).
8. Dykman LA, Volokh OA, Gromova OV, Durakova OS, Vorobyova SA, Kireev MN, et al. Preparation and characterization of antibodies to protective vibrio cholera antigens conjugated with gold nanoparticles. Reports of the Russian Academy of Sciences. Life Sciences. 2020;490(1):27-30. DOI: 10.31857/S2686738920010084 (In Russian).
9. Bellich B, D'Agostino I, Semeraro S, Gamini A, Cesàro A. "The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans. Mar Drugs. 2016 May 17;14(5):99. DOI: 10.3390/md14050099
10. Paul P, Kolesinska B, Sujka W. Chitosan and Its Derivatives – Biomaterials with Diverse Biological Activity for Manifold Applications. Mini Rev Med Chem. 2019;19(9):737-750. DOI: 10.2174/1389557519666190112142735
11. Li X, Min M, Du N, Gu Y, Hode T, Naylor M, et al. Chitin, chitosan, and glycosylated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. Clin Dev Immunol. 2013;2013:387023. DOI: 10.1155/2013/387023
12. Soares E, Jesus S, Borges O. Chitosan:  $\beta$ -glucan particles as a new adjuvant for the hepatitis B antigen. Eur J Pharm Biopharm. 2018 Oct;131:33-43. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.07.018
13. Whelan AO, Flick-Smith HC, Homan J, Shen ZT, Carpenter Z, Khoshkenar P, et al. Protection induced by a *Francisella tularensis* subunit vaccine delivered by glucan particles. PLoS One. 2018 Oct 8;13(10):e0200213. DOI: 10.1371/journal.pone.0200213
14. Kurashova S, Dzagurova TK, Ishmukhametov A, Egorova MS, Balovneva MV, Sotskova SE, et al. Carbohydrate-based adjuvants for vaccine production. Biologics. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2018;18(2):81-91. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-2-81-91 (In Russian).
15. Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Wang JP, Specht CA, Levitz SM. Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal  $\beta$ -glucans and toll-like receptor agonists. Infect Immun. 2009 May;77(5):1774-81. DOI: 10.1128/IAI.00086-09
16. Dubois M, Gilles KA, Hamilton J, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 1956;28:350-356.
17. Mukhopadhyay S, Nandi B, Ghose AC. Antibodies (IgG) to lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 mediate protection through inhibition of intestinal adherence and colonisation in a mouse model. FEMS Microbiol Lett. 2000 Apr 1;185(1):29-35. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09036.x

## References

1. Fedorova VA, Tereshkina NE, Gromova OV, Syrova NA, Devdariani ZL, Ermakov NM, et al. New methods of control of immunogen synthesis in the production of chemical vaccine against cholera caused by *V. cholerae* O139. Biotechnology. 1999;2:82-88. (In Russian).
2. Syrova NA. Preparation, characterization and biotechnological aspects of the application of poly- and monoclonal antibodies to *Vibrio cholerae* O1 Inaba and Ogawa antigens. Abstract of the dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences. Saratov, 2005. (In Russian).
3. Durakova OS, Gromova OV, Kireev MN, Vorobeva SA, Klokova OD, Livanova LF, et al. The use of dot-immunoassay to determine the specific activity of antigens in the production of cholera vaccine. Bulletin of Biotechnology and Physico-chemical Biology n.a. Yu.A.Ovchinnikov. 2018;14(4):10-13. (In Russian).
4. Vorobeva SA, Durakova OS, Volokh OA, Gromova OV. The possibility of determining the specific activity of O-AG in the production of cholera chemical vaccine using dot analysis. News of Saratov University. A new series. Chemistry series. Biology. Ecology. 2018;18(3):318-319. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319 (In Russian).
5. Mikhailova VA. Development of technology for obtaining rabbit cholera agglutinating O-serum. Abstract of the dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences, Irkutsk, 1998. (In Russian).

## Информация о соавторах:

Громова Ольга Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Киреев Михаил Николаевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Волох Оксана Александровна, кандидат биологических наук, заведующая отделом профилактических препаратов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

## Information about co-authors:

Olga V. Gromova, MD, PhD, Senior Researcher laboratory of cholera vaccine, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Michael N. Kireev, MD, PhD, Leading Researcher laboratory of cholera vaccine, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Oksana A. Volokh, PhD (Biology), head of the Department of Preventive Drugs, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор