

Эталонные линии штаммов *Vibrio cholerae* для производства «Вакцины холерной бивалентной химической»

О.В.Громова, О.С.Дуракова, С.А.Воробьева, А.В.Гаева, Н.И.Белякова, Я.М.Краснов,
О.А.Лобовикова, О.А.Волох

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

Для производства вакцины холерной бивалентной химической используются природные токсигенные штаммы-продуценты ее специфических компонентов *V. cholerae* 569B и *V. cholerae* M-41.

Целью работы была проверка стабильности культурально-морфологических, биохимических, серологических, иммуногенных, вирулентных и токсигенных свойств штаммов-продуцентов холерной вакцины в производственных условиях.

Материалы и методы. На основе комплексных исследований современными методами (атомно-силовая микроскопия и трансмиссионная электронная микроскопия, полногеномное секвенирование, дот-иммуноанализ, радиальный пассивный иммунный гемолиз) получены новые информативные характеристики культурально-морфологических свойств и показана стабильность нуклеотидных последовательностей полного генома штаммов *V. cholerae* 569B и M-41.

Результаты. Исследованные эталонные линии штаммов *V. cholerae* 569B (KM2129) и M-41 (KM2130) депонированы в Государственную коллекцию ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, химическая холерная вакцина, штаммы-продуценты, полногеномное секвенирование

Для цитирования: Громова О.В., Дуракова О.С., Воробьева С.А., Гаева А.В., Белякова Н.И., Краснов Я.М., Лобовикова О.А., Волох О.А. Эталонные линии штаммов *Vibrio cholerae* для производства «Вакцины холерной бивалентной химической». Бактериология. 2024; 9(2): 29–34. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-29-34

Reference lineages of *Vibrio cholerae* strains for the production of “Chemical Bivalent Cholera Vaccine”

O.V.Gromova, O.S.Durakova, S.A.Vorobeveva, A.V.Gaeva, N.I.Belyakova, Ya.M.Krasnov,
O.A.Lobovikova, O.A.Volokh

Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of Rosпотребнадзор, Saratov, Russian Federation

Strains *V. cholerae* 569B and *V. cholerae* M-41 are natural toxigenic strains producing specific components of the bivalent chemical cholera vaccine.

The purpose of the work was to test the stability of the cultural-morphological, biochemical, serological, immunogenic, virulent and toxigenic properties of cholera vaccine-producing strains under production conditions.

Materials and methods. Based on complex studies using modern methods (atomic force microscopy and transmission electron microscopy, whole-genome sequencing, dot-immunoassay, radial passive immune hemolysis), new informative characteristics of cultural and morphological properties were obtained and the stability of nucleotide sequences of the complete genome of *V. cholerae* strains 569B and M was shown -41.

Results. The studied reference lines of *V. cholerae* strains 569B (KM2129) and M-41 (KM2130) were deposited in the State Collection of the FSSI Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of Rosпотребнадзор.

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

For citation: Gromova O.V., Durakova O.S., Vorobeveva S.A., Gaeva A.V., Belyakova N.I., Krasnov Ya.M., Lobovikova O.A., Volokh O.A. Reference lineages of *Vibrio cholerae* strains for the production of “Chemical Bivalent Cholera Vaccine”. Bacteriology. 2024; 9(2): 29–34. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-29-34

Для корреспонденции:

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

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Телефон: (8452) 26-2131

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 20.11.2023, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Olga V. Gromova, PhD, MD, senior researcher at the Laboratory of cholera vaccines, Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of Rosпотребнадзор

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

Phone: (8452) 26-2131

E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 20.11.2023, accepted for publication 28.06.2024

В связи с высоким уровнем заболеваемости холерой в мире [1, 2] и угрозой заноса инфекции из эндемичных стран потребность в эффективной вакцине против холеры чрезвычайно актуальна [3–5]. В Российской Федерации (РФ) разработана и выпускается «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой», производства ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора [5–7].

Производство вакцин является сложным, длительным процессом и осуществляется в соответствии с требованиями «Правил надлежащей производственной практики» (GMP), утвержденными приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 4.06.2013 №916 (ред. от 18.12.2015), и Государственной Фармакопеи (ГФ) РФ XIV [8–10]. Данные нормативные документы включают комплекс требований к производству и контролю качества иммунологических лекарственных препаратов. Производство вакцин предусматривает обязательный поэтапный контроль на разных стадиях технологического процесса, включая контроль исходного сырья, полуфабриката и готовой лекарственной формы [11].

Одним из ключевых требований к штаммам-продуцентам, используемым в производстве иммунологических препаратов, является их стабильность, которая заключается в сохранении основных культурально-морфологических, физиологических и продуктивных свойств в условиях производственного цикла [ГФ РФ XIV, 2018]. Штаммы *Vibrio cholerae* 569В серовара Инаба и *V. cholerae* М41 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, полимеразная цепная реакция (ПЦР)) и целого ряда морфометрических характеристик, представляет интерес и будет информативным применением современных методов для оценки штаммов-продуцентов [12–15]. Следует отметить перспективность применения для характеристики производственных штаммов таких методов, как атомно-силовая и трансмиссионная микроскопия, так как факторы окружающей среды могут привести к изменению поверхностных структур клетки [13, 14].

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 [16]. Согласно промышленному регламенту, для оценки свойств производственных штаммов используют комплекс тестов *in vivo* и *in vitro*.

В настоящее время для совершенствования подходов по верификации вакцинных штаммов в процессе длительного хранения для определения их 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 оценки стабильности. В работе Л.В.Саяпиной с соавт. [17], посвященной изучению ста-

бильности вакцинного штамма туляремийного микроба, было отмечено, что в настоящее время в нормативных документах отсутствуют требования к генетической стабильности штаммов-продуцентов. Авторы 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.

Е.В.Острашевской с соавт. [18] были проведены полногеномное секвенирование и последующий сравнительный анализ образцов субштамма *Mycobacterium bovis* BCG-1 (Russia) от рабочего банка до конечного пассажа производственного культивирования, а также производственных серий вакцины БЦЖ. Авторы отмечают, что стабильность генома субштамма опосредованно подтверждает стабильность производственных условий культивирования и качество производственного процесса.

В связи с вышеизложенным нами была поставлена цель – сохранение эталонных линий штаммов-продуцентов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 с характерными свойствами для обеспечения производства вакцины.

Материалы и методы

Культуральные свойства штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 изучали в посевах на бульоне и на агаре Хоттингера (рН 7,6 ± 0,1) после 19 ± 1 ч инкубации при температуре 37 ± 1°C. Биохимические свойства штаммов *V. cholerae* определяли с использованием «Набора для идентификации *Enterobacteriaceae* и других неприхотливых грамотрицательных бактерий API 20E» (BioMerieux, Франция). Серологические свойства проверяли в реакции агглютинации (РА) с сыворотками диагностическими: холерной O1 адсорбированной сухой для РА (ТУ 8938-009-01898109-2007), холерными Огава и Инаба адсорбированными сухими для РА (ТУ 8938-010-0189109-2007), холерной RO адсорбированной сухой для РА (ТУ 8938-011-0898109-2007). Иммуногенные свойства штаммов проверяли на белых нелинейных мышцах массой 11 ± 1 г смешанного поголовья. Вирулентные свойства штамма *V. cholerae* 569В изучали путем внутрикишечного заражения кроликов-сосунков. Содержание животных и манипуляции проводили в соответствии с Директивой №2010/63/ЕС Европейского парламента Совета Европейского союза от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей» (СПб.; 2010). Протоколы исследований одобрены комиссией по биоэтике «Российского противочумного института «Микроб».

Токсигенные свойства штамма *V. cholerae*. Через 19 ± 1 ч инкубации при температуре 37 ± 1°C колонии штамма 569В изучали на:

- присутствие в хромосоме гена *ctxA* с помощью тест-системы для выделения ДНК *V. cholerae* (*ctxA+*) методом ПЦР (ГенХол) – проводили согласно инструкции к тест-системе;
- способность продуцировать токсин во внешнюю среду в реакции пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) на чашках с агаром Хоттингера (рН 7,7 ± 0,1) и синказной средой [19].

Морфологию клеток контролировали методами световой (окрашивание мазков по Граму) и электронной просве-

Таблица 1. Праймеры, используемые в лабораторном испытании
 Table 1. Primers used in laboratory testing

Ген / Gene	Название праймера / Primer name	Последовательность праймера (5' – 3') / Primer sequence (5' – 3')	Длина амплифицируемого фрагмента, п.н. / Length of amplified fragment, bp.	Источник / Reference
<i>ctxB</i>	<i>ctxB-F</i>	GGGAATGCTCCAAGATCATCGATGAGTAATAC	600	Brumfield K.D. et al., 2018
	<i>ctxB-R</i>	CATCATCGAACCACAAAAAGCTTACTGAGG		
<i>wbe (rfb)</i>	<i>wbe-F</i>	CCCCGAAAACCTAATGTGAG	638	Goel A.K. et al., 2007
	<i>wbe-R</i>	TCTATGTGCTGCGATTGGTG		

чивающей (методом негативного контрастирования) микроскопии (ТЭМ). С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) методами полуконтактным и рассогласования измеряли морфометрические параметры бактериальной клетки и оценивали шероховатость поверхности клеточной стенки.

Исследования 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: полуконтактным и рассогласования. Обработку изображений проводили с помощью встроенного программного обеспечения Nova.

Специфическую активность холерного токсина и О-антигена определяли методом непрямого дот-иммуноанализа с конъюгатом на основе белка А, меченного золотыми наночастицами (ДИА ЗНЧ) [20].

Анализ штаммов на присутствие в хромосоме гена *ctxA* проводили с использованием тест-системы для выявления ДНК *V. cholerae* (*ctxA*+) (ГенХол) (ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб») методом ПЦР.

Присутствие генов *ctxB* и *wbe (rfb)* у штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 определяли с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, представленных в табл. 1.

Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1–2%-м агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл этидия бромида с последующим просмотром геля в ультрафиолетовом свете. Оценка результатов проводилась при их сравнении с положительным контролем. В качестве такового для ПЦР на гены *ctxA* и *ctxB* использовали водный раствор ДНК *V. cholerae* 569В, для гена *wbe (rfb)* – водный раствор ДНК *V. cholerae* М-41.

Для приготовления образца для ПЦР клетки ночных культур ресуспендировали в 1 мл физиологического раствора до концентрации 10⁷. Подготовку проб проводили в соответствии с МУ1.3.2569-09. Полногеномное секвенирование образцов штаммов *V. cholerae* 569В и М-41, отобранных на разных этапах культивирования, проводили на платформе Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием чипа Ion 318 Chip Kit и набора реагентов Ion PGM Hi-Q View Chef 400 Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Покрытие нуклеотидной последовательности генома, исследуемого на каждом из этапов культивирования штаммов, составило от ×54 до ×102. Сборку единичных прочтений (ридов) проводили с помощью программы Newbler 2.6 (Roche, Швейцария).

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований было показано, что производственные штаммы *V. cholerae* 569В и М-41 на всех этапах культивирования были типичными для S-формы по морфологическим, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам. Штаммы обладали вирулентными, токсигенными и иммуногенными свойствами (табл. 2).

В предыдущей работе нами был проведен комплексный анализ стабильности штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 в следующих пробах: I генерации (19-часовые культуры штаммов *V. cholerae* 569В и М-41 на плотной питательной среде); II генерации (6-часовые бульонные культуры); III генерации (17-часовая бульонная культура); 5 ч (экспоненциальная фаза роста) и 10 ч (стационарная фаза роста) культивирования в биореакторе [21].

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 пробах.

Методом АСМ было определено, что морфометрические показатели микробных клеток штамма *V. cholerae* М-41 оставались практически неизменными в I–IV генерациях и составляли в среднем по следующим показателям: длина – 2,05 ± 0,1 мкм, ширина – 0,64 ± 0,05 мкм, высота – 0,26 ± 0,03 мкм. Для штамма *V. cholerae* 569В в процессе глубинного культивирования к 10-му часу клетки в среднем изменили свои линейные размеры в сторону увеличения длины (с 2,4 ± 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 оставалась практически неизменной, что косвенно свидетельствует о стабильности поверхностных структур бактерий. 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 визуализировался жгутик, независимо от штамма.

Во всех исследованных пробах методом ПЦР были выявлены фрагменты ДНК, свидетельствующие о наличии полноценного гена *ctxA*, что свидетельствует о стабильности производственных штаммов по показателю «токсигенность», *ctxB* – о продукции иммуногенной В-субъединицы холерного токсина, *wbe (rfb)* – о продукции О-антигена. При постановке РПИГ вокруг макроколоний штамма *V. cholerae* 569В наблюдалась зона иммунного гемолиза 3,5 ± 0,5 мм, при требованиях НД 2–4 мм, что свидетельствует о способности штамма продуцировать токсин во внешнюю среду.

Таблица 2. Иммуногенные, вирулентные и токсигенные свойства штаммов
 Table 2. Immunogenic, virulent and toxigenic properties of strains

Штамм <i>V. cholerae</i> / Strain <i>V. cholerae</i>	Иммуногенность (на белых беспородных мышах) / Immunogenicity (on white mongrel mice)		Вирулентные свойства (холерогенность на кроликах-сосунках) / Virulent properties (cholero-genicity on suckling rabbits)	
	Требования НД / ND requirements	Фактически (заражающий штамм) / Actually (infecting strain)	Требования НД / ND requirements	Фактически / Actually
569B	ED ₅₀ ≤ 1•10 ⁷ м.к. / ED ₅₀ ≤ 1•10 ⁷ m.c.	ED ₅₀ = 4,22•10 ⁶ м.к. (<i>V. cholerae</i> P-3122) / ED ₅₀ = 5,62•10 ⁵ м.к. (<i>V. cholerae</i> M-879)	Накопление жидкости в толстом кишечнике 9 ± 1 дневных кроликов- сосунков в дозе 10 ² и 10 ³ м.к. / Accumulation of fluid in the large intestine of 9 ± 1 day-old suckling rabbits at a dose of 10 ² and 10 ³ m.c.	На каждую дозу по 3 кролика-сосунка. У всех кроликов выражен синдром холерогенности / 3 suckling rabbits for each dose. All rabbits exhibit cholero-genic syndrome
M-41	ED ₅₀ ≤ 1•10 ⁷ м.к. / ED ₅₀ ≤ 1•10 ⁷ m.c.	ED ₅₀ = 3,16•10 ⁵ м.к. (<i>V. cholerae</i> P-3122) ED ₅₀ = 2,37•10 ⁶ м.к. (<i>V. cholerae</i> M-879)	Накопление жидкости в толстом кишечнике 9 ± 1 дневных крольчат в дозе 10 ⁵ и 10 ⁷ м.к. / Accumulation of fluid in the large intestine of (9 ± 1) day-old rabbits at a dose of 10 ⁵ m.c. 10 ⁷ m.c.	На каждую дозу по 3 кролика-сосунка. У всех кроликов выражен синдром холерогенности / 3 suckling rabbits for each dose. All rabbits exhibit cholero-genic syndrome

Иммунохимические свойства штаммов были изучены разработанным нами методом непрямого ДИА ЗНЧ. В образцах штамма *V. cholerae* 569B специфическая активность холерного токсина и О-антигена Инаба в ДИА ЗНЧ составляла в среднем 1:8. Специфическая активность О-антигена Огава штамма *V. cholerae* М-41 в ДИА ЗНЧ также составляла 1:8.

На данный момент современные технологии открывают новые возможности исследований молекулярно-генетической структуры штаммов *V. cholerae*. Методом полногеномного секвенирования была исследована структура ДНК холерного вибриона на этапах культивирования. В табл. 3 приведены названия профагов, островов патогенности, генов и локусов, идентичность нуклеотидной последовательности которых на этапах производственного цикла культивирования штаммов *V. cholerae* М-41 и 569В проверялась в первую очередь.

Сравнительный анализ собранных нуклеотидных последовательностей полного генома штамма *V. cholerae* М-41, полученных для клеток, отобранных на начальном, промежуточном и финальном этапе производственного цикла культивирования штамма *V. cholerae* М-41, показал полную идентичность этих секвенированных геномов. Аналогично сравнение секвенированных образцов штамма *V. cholerae* 569В, полученных

для клеток, отобранных на разных стадиях производственного цикла, показало полную идентичность этих геномов.

С использованием комплекса методов (АСМ и ТЭМ, полногеномное секвенирование, дот-иммуноанализ с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченого коллоидным золотом, радиальный пассивный иммунный гемолиз) получены новые информативные характеристики культурально-морфологических свойств и показана стабильность нуклеотидных последовательностей полного генома штаммов *V. cholerae* 569В и М-41.

В ГКПБ ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора депонированы два штамма *V. cholerae* О1 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».

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Таблица 3. Сравнительная характеристика данных полногеномного секвенирования штаммов *V. cholerae* 569В и М-41
 Table 3. Comparative characteristics of whole-genome sequencing data of *V. cholerae* strains 569B and M-41

Штамм, этап отбора клеток при культивировании <i>V. Cholerae</i> / Strain, stage of cell selection during cultivation of <i>V. cholerae</i>	Профайг / Prophage		Остров патогенности / Island of pathogenicity		Гены / Genes			Биосинтез антигена / Biosynthesis of antigens
	CTXφ (ctxA, ctxB1)	RSI (rstR classical)	VPI-I	VPI-II	ToxT	ToxR	ToxS	локус O1 (wbe)*
569B, I генерация / I generation	+	+	+	+	+	+	-	+
569B, II генерация / II generation	+	+	+	+	+	+	-	+
569B, III генерация / III generation	+	+	+	+	+	+	-	+
569B, IV генерация / IV generation	+	+	+	+	+	+	-	+
M-41, I генерация / I generation	+	+	+	+	+	+	+	+
M-41, II генерация / II generation	+	+	+	+	+	+	+	+
M-41, III генерация / III generation	+	+	+	+	+	+	+	+
M-41, IV генерация / IV generation	+	+	+	+	+	+	+	+

*Локус, содержащий необходимые для биосинтеза антигена O1 гены, расположенные между фланкирующими генами *gmhD* и *rjg* [Seed K.D. et al., 2012]. /
 *Locus containing genes necessary for the biosynthesis of the O1 antigen, located between the flanking genes *gmhD* and *rjg* [Seed K.D. et al., 2012].

Токсигенные свойства / <i>Toxigenic properties</i>		Реакция пассивного иммунного гемолиза / <i>Passive immune hemolysis reaction</i>	
ПЦР с «Тест-системой для выявления ДНК <i>V. cholerae</i> (ctxA+) методом ПЦР (ГенХол)» <i>PCR with "Test system for detecting DNA of V. cholerae (ctxA+) by polymerase chain reaction (GenHol)"</i>	Фактически / <i>Actually</i>	Требования НД / <i>ND requirements</i>	Фактически / <i>Actually</i>
Требования НД / <i>ND requirements</i>	Фактически / <i>Actually</i>	Требования НД / <i>ND requirements</i>	Фактически / <i>Actually</i>
Присутствие в хромосоме гена <i>ctxA</i> / <i>Presence of the ctxA gene on the chromosome</i>	Ген <i>ctxA+</i> присутствует / <i>ctxA+ gene is present</i>	Зона пассивного иммунного гемолиза – 2-4 мм / <i>Zone of passive immune hemolysis – 2-4 mm</i>	Зона пассивного иммунного гемолиза – 3,5 мм / <i>Zone of passive immune hemolysis – 3.5 mm</i>
Присутствие в хромосоме гена <i>ctxA</i> / <i>Presence of the ctxA gene on the chromosome</i>	Ген <i>ctxA+</i> присутствует / <i>ctxA+ gene is present</i>	–	–

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- World Health Organization. Cholera. Weekly Epidemiological Record. Geneva: WHO. 2020;96(37):445-454.
- WHO [Electronic resource]. Available at: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437> (accessed 30.03.2023).
- Беспалова ИА, Иванова ИА, Омельченко НД, Филиппенко АВ, Труфанова АА. Современное состояние специфической профилактики холеры. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018;17(1):55-61.
- Носков АК, Кругликов ВД, Москвитина ЭА, Миронова ЛВ, Монахова ЕВ, Соболева ЕГ, и др. Холера: анализ и оценка эпидемиологической обстановки в мире и России. Прогноз на 2023 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2023;1:56-66. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-56-6
- Онищенко ГГ, Попова АЮ, Кутырев ВВ, Смирнова НИ, Щербакоева СА, Москвитина ЭА, и др. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016;1:89-101.
- Джапаридзе МН, Наумов АВ, Мелещенко МВ, Никитина ГП. Способ получения пероральной химической вакцины. Патент №2076734 РФ, МПК А61К 39/00, А61К 35/76; 1993.
- Анисимов ПИ, Адамов АК, Джапаридзе МН, Никитина ГП. Способ производства вакцины для профилактики холеры. Патент № 2080121 РФ, МПК А61К39/00; 1997.
- Приказ от 6.12.2021 г. №1122н об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемиологическим показателям и порядка проведения профилактических прививок. Министерство здравоохранения Российской Федерации. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/727605537?marker=65201M> (дата обращения 31.05.2022).
- Решение от 3.11.2016 №77 об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза. Совет Евразийской экономической комиссии. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://svsps.gov.ru/sites/default/files/npafiles/2021/10/22/pravila_nadlezhashchey_proizvodstvennoy_praktiki.pdf (дата обращения 22.12.2022).
- Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание. М.: ФЭМБ, 2018.
- Медуницын НВ. Государственная система оценки безопасности вакцин. Инф. бюл. Вакцинация. 2000;8(2):3-4.
- Челдышова НБ, Крицкий АА, Краснов ЯМ, Смирнова НИ. Анализ результатов фрагментарного и полногеномного секвенирования атипичных штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара, вызвавших вспышку азиатской холеры в России. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015;5(20):24-31.
- Ерохин ПС, Уткин ДВ, Осина НА, Бойко АВ, Кузнецов АС, Куклев ВЕ, и др. Современное состояние изучения ультраструктуры поверхности клеточной стенки микроорганизмов в условиях неблагоприятного воздействия факторов биотической и абиотической природы методами атомно-силовой микроскопии. Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2016;16(2):186-189.
- Уткин ДВ, Кузнецов ОС, Ерохин ПС, Спицын АН, Волох ОА, Осина НА. Разработка методических подходов изучения возбудителей особо опасных инфекционных болезней методом атомно-силовой микроскопии. Проблемы особо опасных инфекций. 2012;2(112):62-64.
- Hartmann M, Berditsch M, Hawecker J, Ardakani MF, Gerthsen D, Ulrich AS. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Aug;54(8):3132-42. DOI: 10.1128/AAC.00124-10
- 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;5326-5336.
- Саяпина ЛВ, Осина НА, Нарышкина НА, Федоров АВ, Краснов ЯМ, Давыдов ДС, и др. Совершенствование подходов по верификации вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;3:137-144. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-137-144
- Острашевская ЕВ, Винокурова ЕА, Шитиков ЕА. Изучение генетической стабильности субштамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) в процессе производства вакцины БЦЖ. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018;2:58-67. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-2-58-67
- Шагинян ИА, Маракуша БН. Модификация метода пассивного иммунного гемолиза на плотной среде для выявления продукции термоллабильных энтеротоксинов штаммами холерных вибрионов и кишечной палочки. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1983;2:92-96.
- Дуракова ОС, Громова ОВ, Киреев МН, Воробьева СА, Клокова ОД, Ливанова ЛФ, и др. Применение дот-иммуноанализа для определения специфической актив-

ности антигенов в производстве холерной вакцины. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2018;14(4):10-3.

21. Дуракова ОС, Воробьева СА, Гаева АВ, Краснов ЯМ, Кузнецов ОС, Ерохин ПС, и др. Изучение стабильности свойств штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов активных компонентов холерной химической вакцины. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;2:70-74. DOI:10.21055/0370-1069-2022-2-70-74.

References

1. World Health Organization. Cholera. Weekly Epidemiological Record. Geneva: WHO, 2020;96(37):445-454.
2. WHO [Electronic resource]. Available at: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437> (accessed 30.03.2023).
3. Bepalova IA, Ivanova IA, Omel'chenko ND, Filippenko AV, Trufanova AA. Current state of specific cholera prophylaxis. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2018;17(1):55-61. (In Russian).
4. Noskov AK, Kruglikov VD, Moskvitina EA, Mironova LV, Monakhova EV, Soboleva EG, et al. Cholera: analysis and assessment of epidemiological situation around the world and in Russia (2013–2022). Forecast for 2023. Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2023;1:56-66. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-56-66 (In Russian)
5. Onishchenko GG, Popova AYU, Kutryev VV, Smirnova NI, Shcherbakova SA, Moskvitina EA, et al. Relevant problems of epidemiological surveillance, laboratory diagnostics and prevention of cholera in the Russian Federation. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2016;1:89-101. (In Russian).
6. Dzhaparidze MN, Naumov AV, Meleshchenko MV, Nikitina GP. A method for the production of oral chemical vaccine. Patent No 2076734 of the Russian Federation, IPC A61K 39/00, A61K 35/76; 1993. (In Russian).
7. Anisimov PI, Adamov AK, Dzhaparidze MN, Nikitina GP. Method for the production of a vaccine for the prevention of cholera. RF Patent No 2080121, IPC A61K39/00; 1997. (In Russian).
8. Order No. 1122n dated 6 Dec 2021 On the approval of the national calendar of preventive vaccinations, the calendar of preventive vaccinations upon epidemic indications and the procedure for preventive vaccinations. Ministry of Health of the Russian Federation. [Electronic source]. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/t727605537?marker=6520IM> (accessed 31 May 2022). (In Russian).
9. Decision No 77 dated 3 Nov 2016 On the approval of the Rules of Good Manufacturing Practice of the Eurasian Economic Union. Council of the Eurasian Economic Commission. [Electronic source]. Available at: https://svsps.gov.ru/sites/default/files/npafiles/2021/10/22/pravila_nadlezhashchey_proizvodstvennoy_praktiki.pdf (accessed 22 Dec 2022) (In Russian).
10. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Moscow: FEML, 2018. (In Russian).
11. Medunitsyn NV. State Vaccine Safety Assessment System. Inf. byul. Vaccination. 2000;8(2):3-4. (In Russian).
12. Cheldyshova NB, Kritsky AA, Krasnov YaM, Smirnova NI. Analysis of the results of fragmentary and genome-wide sequencing of atypical *Vibrio cholerae* strains of the classical biovar that caused the outbreak of Asian cholera in Russia. Epidemiology and Infectious Diseases. 2015;5(20):24-31. (In Russian).
13. Erokhin PS, Utkin DV, Osina NA, Boiko AV, Kuznetsov AS, Kuklev VE, et al. The current state of studying the ultrastructure of the cell wall surface of microorganisms under the adverse effects of factors of biotic and abiotic nature using atomic force microscopy. News of the Saratov University. A New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology. 2016;16(2):186-189. (In Russian).
14. Utkin DV, Kuznetsov OS, Erokhin PS, Spitsyn AN, Volokh OA, Osina NA. Development of Methodological Approaches for Examination of Particularly Dangerous Infectious Diseases Agents by Means of Atomic Power Microscopy. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2012;2(112):62-64. (In Russian).

15. Hartmann M, Berditsch M, Hawecker J, Ardakani MF, Gerthsen D, Ulrich AS. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Aug;54(8):3132-42. DOI: 10.1128/AAC.00124-10
16. FS.3.3.1.0020.15 Chemical bivalent cholera vaccine, tablets coated with an intestinal-soluble coating. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition (Volume II). M.: FEMB. 2018;5326-5336. (In Russian).
17. Sayapina LV, Osina NA, Naryshkina NA, Fedorov AV, Krasnov YaM, Davydov DS, et al. Improvement of approaches to verification of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG during long-term storage. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2022;3:137-144. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-137-144 (In Russian).
18. Ostrashevskaya EV, Vinokurova EA, Shitikov EA. Study of the genetic stability of the *M. bovis* BCG-1 sub-strain (Russia) in the process of BCG vaccine production. Journal Microbiol. 2018;2:58-67. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-2-58-67 (In Russian).
19. Shaginyan IA, Marakusha BN. Modification of the method for passive immune hemolysis on a solid medium to detect the production of thermolabile enterotoxins by strains of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1983;2:92-6. (In Russian).
20. 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 Physical-Chemical Biology n.a. Yu.A.Ovchinnikov. 2018;14(4):10-3. (In Russian).
21. Durakova OS, Vorobeva SA, Gaeva AV, Krasnov YaM, Kuznetsov OS, Erokhin PS, et al. Investigating the stability of the properties of *Vibrio cholerae* strains – producers of active components of the chemical cholera vaccine. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2022;2:70-74. DOI:10.21055/0370-1069-2022-2-70-74 (In Russian).

Информация о соавторах:

Дуракова Оксана Сергеевна, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

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

Гаева Анна Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Белякова Нина Ивановна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Краснов Ярослав Михайлович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории геномного и протеомного анализа ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Лобовикова Оксана Анатольевна, кандидат биологических наук, заведующая отделом биологического и технологического контроля 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:

Oksana S. Durakova, Researcher, Laboratory of cholera vaccines, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Svetlana A. Vorobeva, Junior Researcher, Laboratory of cholera vaccines, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Anna V. Gaeva, PhD in Biological Sciences, Researcher at the Laboratory of cholera vaccines, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Nina I. Belyakova, PhD, MD, Senior Researcher at the Laboratory of cholera vaccines, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Yaroslav M. Krasnov, PhD in Chemical Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of genomic and proteomic analysis, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Oksana A. Lobovikova, PhD in Biological Sciences, Head of the Department of Biological and Technical Control, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор

Oksana A. Volokh, PhD in Biological Sciences, Head of the Department of Preventive Drugs, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rosпотребнадзор