

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-101-105

УДК 616.932:615.371

В.Р. Вольников, О.С. Дуракова, Р.Р. Салихов, Ю.И. Самохвалова, Н.Г. Авдеева, О.Д. Клокова,
М.Н. Киреев, О.А. Волох

Экспериментальное обоснование возможности использования среды на основе ферментативного гидролизата фибрина для получения компонентов холерной химической вакцины

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

Цель работы – экспериментально обосновать возможность использования питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина для получения специфических компонентов холерной химической вакцины: холерогена-анатоксина и О-антигена. **Материалы и методы.** В работе использовали производственные штаммы *Vibrio cholerae* 569B и *V. cholerae* М-41. Глубинное малообъемное культивирование проводили на лабораторном ферментере в течение 8 ч с автоматическим поддержанием параметров культивирования и подкормкой глюкозой на питательной среде на основе ферментативного гидролизата фибрина с показателем рН (8,0±0,1), содержащей (1,0±0,1) г/л аминного азота. Холероген-анатоксин и О-антигены получали из детоксицированных формализированных центрифугатов культуральных жидкостей. Специфическую активность антигенов *V. cholerae* на этапах культивирования и выделения определяли иммунохимическими методами. Изготовление готовой лекарственной формы холерной вакцины и покрытие таблеток кишечнорастворимой оболочкой проводили в соответствии с нормативной документацией. **Результаты и обсуждение.** Показано, что культивирование на среде на основе ферментативного гидролизата фибрина обеспечивает стабильный рост биомассы производственных штаммов *V. cholerae* с высоким уровнем специфической активности антигенов. Сравнительный анализ основных свойств готовой лекарственной формы лабораторных серий с коммерческой серией холерной химической вакцины показал соответствие требованиям нормативной документации. Полученные результаты позволили сделать вывод о возможности применения питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина для культивирования производственных штаммов и получения специфических компонентов холерной вакцины.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холерная вакцина, питательная среда, антигены.

Корреспондирующий автор: Вольников Владислав Романович, e-mail: rusgari@microbe.ru.

Для цитирования: Вольников В.Р., Дуракова О.С., Салихов Р.Р., Самохвалова Ю.И., Авдеева Н.Г., Клокова О.Д., Киреев М.Н., Волох О.А. Экспериментальное обоснование возможности использования среды на основе ферментативного гидролизата фибрина для получения компонентов холерной химической вакцины. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 2:101–105. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-101-105

Поступила 09.11.2022. Отправлена на доработку 18.11.2022. Принята к публ. 20.12.2022.

V.R. Vol'nikov, O.S. Durakova, R.R. Salikhov, Yu.I. Samokhvalova, N.G. Avdeeva, O.D. Klokov,
M.N. Kireev, O.A. Volokh

Experimental Substantiation of Feasibility of Using Enzymatic Fibrin Hydrolyzate-Based Medium to Obtain Components of Chemical Cholera Vaccine

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

Abstract. The aim of the study was to experimentally substantiate the possibility of using a nutrient medium based on enzymatic fibrin hydrolyzate in order to obtain specific components of chemical cholera vaccine: cholero-gen-anatoxin and O-antigen. **Materials and methods.** We used production strains of *Vibrio cholerae* 569B and *V. cholerae* M-41. Submerged low-volume cultivation was carried out in a laboratory fermenter for 8 hours, with automatic maintenance of cultivation parameters and feeding with glucose on the nutrient medium based on enzymatic fibrin hydrolyzate, containing (1.0±0.1) g/l of amine nitrogen, pH being (8.0±0.1). Cholero-gen-anatoxin and O-antigens were obtained from detoxified formalin-treated centrifugates of culture liquids. The specific activity of *V. cholerae* antigens at the stages of cultivation and isolation was determined applying immunochemical methods. The preparation of the finished dosage form of the cholera vaccine and the coating of the tablets with an enteric coating was carried out in accordance with the regulatory documentation. **Results and discussion.** It has been shown that cultivation on the medium based on enzymatic fibrin hydrolyzate provides a stable growth of the biomass of *V. cholerae* production strains with a high level of specific activity of antigens. Comparative analysis of the main properties of the finished dosage form of laboratory batches with a commercial batch of chemical cholera vaccine has demonstrated compliance with the requirements of regulatory documentation. The results obtained has led us to conclusion that it is feasible to use the nutrient medium based on enzymatic fibrin hydrolyzate for cultivating production strains and obtaining specific components of the cholera vaccine.

Key words: *Vibrio cholerae*, cholera vaccine, nutrient medium, antigens.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Vladislav R. Vol'nikov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Vol'nikov V.R., Durakova O.S., Salikhov R.R., Samokhvalova Yu.I., Avdeeva N.G., Klokova O.D., Kireev M.N., Volokh O.A. Experimental Substantiation of Feasibility of Using Enzymatic Fibrin Hydrolyzate-Based Medium to Obtain Components of Chemical Cholera Vaccine. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 2:101–105. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-101-105

Received 09.11.2022. Revised 18.11.2022. Accepted 20.12.2022.

Vol'nikov V.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0791-895X>
Durakova O.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-8823-3524>
Salikhov R.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4980-4109>

Klokova O.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7119-0516>
Volokh O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>

В настоящее время одной из приоритетных задач Всемирной организации здравоохранения является борьба с холерой и ее распространением [1, 2]. В связи с этим проблемы и вопросы, связанные с производством профилактических препаратов соответствующего спектра, являются весьма актуальными [3–5]. В Российской Федерации зарегистрирован и выпускается уникальный препарат – вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой [6]. Данный иммунобиологический лекарственный препарат (ИЛП) производится на базе ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Он представляет собой смесь холерогена-анатоксина (ХА) и О-антигенов (О-АГ), полученных из инактивированных формалином бульонных культур штаммов *Vibrio cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 путем выделения, очистки и концентрирования серноокислым аммонием. Параллельно с выпуском вакцины ведутся исследования с целью оптимизации производственного процесса. Преимущественно они касаются снижения уровня материальных и временных затрат на выпуск готового продукта, импортозамещения, а также возможности использования отходов производства ИЛП. В конструировании питательных сред активно используется гидролизат фибрина – отход производства ИЛП «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади» [6, 7]. Разработана питательная среда на основе сухого гидролизата фибрина (ФГФ) для культивирования холерных вибрионов и получения биомассы [7]. Кроме того, ранее авторами экспериментально обосновано применение данной питательной среды для получения холерного токсина [8]. Учитывая высокую эффективность питательной среды на основе ФГФ для культивирования штаммов *V. cholerae* – продуцентов протективных антигенов, а также актуальность внедрения малоотходных технологий, перспективным является применение данной питательной среды для получения компонентов, используемых в производстве вакцины холерной бивалентной химической, таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой.

Исходя из вышесказанного, целью нашей работы явилась оценка возможности использования питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина для получения компонентов и лабораторных серий холерной химической вакцины и их изучения.

Материалы и методы

В работе использовали производственные штаммы классического биовара *V. cholerae* 569В серовара

Инаба и *V. cholerae* М-41 серовара Огава – продуценты холерного экзотоксина (холерогена) и О-антигена, инактивированных формалином, с последующим получением холерогена-анатоксина и О-антигена. Глубинное малообъемное культивирование проводилось в условиях лабораторного ферментера в течение 8 ч с автоматическим поддержанием параметров культивирования и подкормкой глюкозой. Субстратом для культивирования являлась питательная среда на основе ФГФ [7] с показателем аминного азота ($1,0 \pm 0,1$) г/л и рН ($8,0 \pm 0,1$).

Дальнейшая обработка полученных жидких фракций (полуфабрикатов) предполагала отделение клеточной массы и детоксикацию формализированной культуры, а затем ее концентрирование на ультрафильтрационной установке [9]. Половина безмикробных центрифугатов сконцентрирована методом тангенциальной ультрафильтрации на мембранах с номинальной отсечкой по молекулярной массе 30 кДа в 10 раз (лабораторная серия № 1); вторая половина использовалась без концентрирования (лабораторная серия № 2). Объем культуральной жидкости для выделения антигенов в обоих случаях составлял 1 л.

Осаждение сульфатом аммония, диализ, стерилизация и фильтрация полученных жидких специфических компонентов – ХА и О-АГ, а также их лиофильное высушивание, приготовление готовой лекарственной формы (таблетка) проводили в соответствии с регламентом производства – «Промышленный регламент на производство вакцины холерной бивалентной химической, таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой ПР № 01898109-65-22» (ПР). В качестве контрольных образцов выбраны лиофилизаты производственных серий специфических компонентов: ХА серии № 271, О-АГ серии № 285, коммерческая серия № 20 препарата «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой».

Полученные в ходе экспериментов компоненты холерной химической вакцины – холероген-анатоксин и О-антиген – оценивали по показателю их специфической активности. Оценку производили на стадии культивирования, после детоксикации (жидкий полуфабрикат), после лиофильной сушки (сухие фракции), в готовой лекарственной форме. Таблетки холерной химической вакцины оценивали также по внешнему виду, средней массе таблетки и распадемости.

Активность холерогена-анатоксина определяли по величине титра в стандартной реакции преципитации в геле по Оухтерлони (РДП) с антихолерогеной сывороткой (АХС), дот-иммуноанализе с конъю-

гатом на основе стафилококкового белка А и наночастиц коллоидного золота (ДИА ЗНЧ) [10], а также по содержанию единиц связывания анатоксина (ЕС). Активность О-антигенов определяли в РДП, реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), в ДИА ЗНЧ с сывороткой диагностической холерной О1.

Результаты и обсуждение

Культивирование производственных штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 на питательной среде на основе ФГФ показало активный рост микробной массы – конечная концентрация во всех образцах составила не менее (38,5±4,3) млрд м.к./мл. Показатели активности выделяемых компонентов на этой стадии были на уровне, соответствующем ПР, – реципрокный титр в РДП был не менее 4 (результат ДИА ЗНЧ является ненормируемым параметром, но указан для наглядности). Так, для холерного токсина данный показатель составлял от 16 до 64 в РДП и от 16 до 128 в ДИА ЗНЧ, для О-антигенов – от 8 до 32 в РДП и от 16 до 32 в ДИА ЗНЧ.

Выделение специфических компонентов холерной вакцины проводили из безмикробного детоксигированного формалином центрифугата (БМЦ).

Получено по две лабораторные серии ХА и О-АГ: лабораторная серия № 1 из 10х концентрата БМЦ, лабораторная серия № 2 – прямым осаждением без стадии концентрирования. Осаждение сульфатом аммония антигенсодержащих фракций с последующим диализом и стерилизацией проводили согласно ПР. Показатели специфической активности антигенных компонентов в РДП соответствовали нормативной документации (НД). Реципрокные титры составляли для О-АГ – 32 у всех образцов, для ХА – 8 и 16 у образцов серий № 1 и 2 соответственно.

После процесса стерилизации и фильтрации жидких фракций проведена лиофильная сушка специфических компонентов холерной вакцины – ХА и О-АГ. В табл. 1 приведены показатели качества (по ПР) полученных лиофилизатов в сравнении с контрольными образцами (контрольная серия).

Из полученных сухих фракций изготовлены таблетки холерной химической вакцины (рисунок), процедуры приготовления проводили в соответствии с ПР.

На следующем этапе изучены основные свойства (в соответствии с НД) полученных таблеток лабораторных серий в сравнении с производственной серией холерной вакцины (табл. 2).

Таблица 1 / Table 1

Сравнительный анализ лиофилизатов специфических компонентов холерной вакцины

Comparative analysis of lyophilizates of cholera vaccine specific components

Показатели Indicators	В соответствии с НД In accordance with regulatory documentation	Контрольная серия Control series	Лабораторная серия № 1 Laboratory Series No. 1	Лабораторная серия № 2 Laboratory Series No. 2
Внешний вид Appearance	Порошкообразная масса коричневато-белого цвета Powdery mass of brownish-white color	Порошкообразная масса коричневато-белого цвета Powdery mass of brownish-white color	Порошкообразная масса темно-коричневого цвета Powdery mass of dark brown color	Порошкообразная масса бело-кремового цвета Powdery mass of white-cream color
Время растворения Dissolution time	Растворим в воде в течение 1–2 минут Soluble in water over 1–2 minutes	1 мин / 1 мин 1 min / 1 min	1,5 мин / 1 мин 1.5 min / 1 min	1 мин / 1 мин 1 min / 1 min
Активность ХА и О-АГ в РДП (обратный титр)* Cholero-gen-anatoxin (ChA) and O-antigen (O-AG) activity in diffusion precipitation reaction (reverse titer)*	Не менее 4 / Не менее 8 At least 4 / At least 8	32 / 64	16 / 32	32 / 32
Активность О-АГ в РНГА (обратный титр) The activity of O-AG in indirect hemagglutination reaction (reverse titer)	Не менее 100 у.е. Not less than 100 c.u.	186 у.е. 186 c.u.	132 у.е. 132 c.u.	213 у.е. 213 c.u.
Активность ХА в ДИА ЗНЧ (обратный титр) Activity of ChA in DOT- immunoassay with a conjugate based on staphylococcal protein A and colloidal gold nanoparticles (reverse titer)	Экспериментальное значение (отсутствует в регламенте) Experimental value (absent in the regulations)	32	16	32

Примечание: * показатель для ХА / показатель для О-АГ.

Note: * an indicator for ChA / an indicator for O-AG.



Готовая лекарственная форма холерной химической вакцины:
1 – контрольная серия; 2 – лабораторная серия № 1; 3 – лабораторная серия № 2

The finished dosage form of the chemical cholera vaccine:
1 – control series; 2 – laboratory series No. 1; 3 – laboratory series No. 2

По результатам сравнительного анализа можно отметить различие в окраске готовых форм таблетированной холерной вакцины. Таблетки лабораторной серии № 1 имеют насыщенный коричневый оттенок, что, возможно, связано с накоплением остаточного пигмента питательной среды в процессе концентрирования культуральной жидкости. Таблетки лабораторной серии № 2 лишены этого недостатка. На основании полученных данных можно сделать вывод, что лабораторная серия № 1 таблетированной холерной вакцины соответствует НД по всем параметрам, кроме показателя «внешний вид»; лабораторная серия № 2 не отличается от контрольной серии по изученным нормируемым показателям.

Таким образом, по итогам экспериментов показана эффективность культивирования производственных штаммов *V. cholerae* на питательной среде на основе ферментативного гидролизата фибрина по основным показателям (урожайность биомассы, специфическая активность антигенов). Экспериментально обосновано, что специфические компоненты холерной вакцины, полученные из производственных штаммов после культивирования на питательной среде на основе ФГФ, могут быть использованы для приготовления таблеточной смеси и дальнейшей формовки таблетки. Выявлено, что активность ХА и О-АГ и основные свойства готовой лекарственной формы (внешний вид, распадаемость, активность компонентов) соответствуют требованиям ПР. На следующем этапе будет проведена проверка специфической безопасности и остаточной токсичности вакцины на лабораторных животных.

В качестве дальнейших перспектив можно выделить масштабирование эксперимента – культивирование штаммов холерного вибриона на основе ФГФ на промышленных реакторах большего объема и дальнейшее изготовление экспериментальной серии холерной химической вакцины; будут проведены экспериментальные концентрирования жидкого препарата на мембранах с различной номинальной

Таблица 2 / Table 2

Сравнительный анализ свойств готовой формы холерной химической вакцины
Comparative analysis of the properties of the finished dosage form of the chemical cholera vaccine

Свойства готовой формы холерной химической вакцины Properties of the finished form of chemical cholera vaccine	В соответствии с НД ФС.3.3.1.0020.15 In accordance with regulatory documentation Pharmacopeia article 3.3.1.0020.15	Контрольная серия (серия № 20) Control series (series No. 20)	Лабораторная серия № 1 Laboratory series No. 1	Лабораторная серия № 2 Laboratory series No. 2
Внешний вид Appearance	Серовато-желтая компактная масса Grayish-yellow compact mass	Серовато-желтая компактная масса Grayish-yellow compact mass	Компактная масса насыщенного коричневого цвета Compact mass of deep brown color	Бледно-желтая компактная масса Pale yellow compact mass
Средняя масса таблетки, г Average tablet weight, g	0,300±0,015	0,295±0,005	0,301±0,006	0,298±0,008
Распадаемость Disintegration	Таблетка устойчива к действию раствора соляной кислоты в течение 3 ч и распадается в растворе натрия гидроксида в течение 1 ч при температуре (37±1) °С The tablet is resistant to hydrochloric acid solution for 3 hours and disintegrates in sodium hydroxide solution within 1 hour at (37±1) °C	Устойчива в течение 3 ч и распалась в течение 25 мин Stable for 3 hours and disintegrates within 25 minutes	Устойчива в течение 3 ч и распалась в течение 16 мин Stable for 3 hours and disintegrates within 16 minutes	Устойчива в течение 3 ч и распалась в течение 32 мин Stable for 3 hours and disintegrates within 32 minutes
Содержание О-антигенов в РНГА (обратный титр) The content of O-antigen in indirect hemagglutination reaction (reverse titer)	Не менее 2000 у.е. Not less than 2000 c.u.	6000 у.е. 6000 c.u.	6000 у.е. 6000 c.u.	8000 у.е. 8000 c.u.
Специфическая активность ХА по ЕС Specific activity of cholero-gen-anatoxin by binding units (BU)	(100000±20000) ЕС/БУ	80000 ЕС/БУ	80000 ЕС/БУ	90000 ЕС/БУ

отсечкой по молекулярной массе для уменьшения количества пигмента с целью улучшения внешнего вида таблетки.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Cholera vaccines: WHO position paper – August 2017. [Электронный ресурс]. URL: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258764/1/WER9234-477-498.pdf>.
2. WHO – Weekly Epidemiological Record. Cholera, 2020. 17 September 2021. No. 37. Vol. 96. P. 445–60. [Электронный ресурс]. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/345267/WER9637-eng-fre.pdf>.
3. Еремин С.А., Алешина Ю.А., Комиссаров А.В., Громова О.В., Васин Ю.Г., Никифоров А.К., Ливанова Л.Ф., Волох О.А., Лобовикова О.А., Бронникова В.С. Методы и технологии культивирования холерного вибриона (обзор). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 4:95–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-95-101.
4. Holmgren J. Modern history of cholera vaccines and the pivotal role of icddr.b. *J. Infect. Dis.* 2021; 224(12 Suppl. 2):S742–S748. DOI: 10.1093/infdis/jiab423.
5. Shaikh H., Lynch J., Kim J., Excler J.L. Current and future cholera vaccines. *Vaccine*. 2020; 38(Suppl. 1):A118–A126. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.12.011.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.
7. Антонычева М.В., Нижегородцев С.А., Еремин С.А., Аленкина Т.В., Шульгина И.В., Вахрушина Н.И., Белоусов А.Д., Жулидов И.М., Никифоров А.К. Питательная среда для глубоководного культивирования холерного вибриона. Патент РФ № 2425866, опубл. 10.08.2011. Бюл. № 22.
8. Дуракова О.С., Громова О.В., Ливанова Л.Ф., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Гаева А.В., Киреев М.Н., Волох О.А. Современные подходы к выделению и очистке холерного токсина. *Бактериология*. 2018; 3(1):59–62. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-59-62.
9. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Алешина Ю.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И., Крайнова А.Г. Способ концентрирования нативных холерогенанатоксина и О-антигена *Vibrio cholerae* O1 классического биовара штамма 569 В серовара Инаба. Патент РФ № 2451522, опубл. 27.05.2012. Бюл. № 15.
10. Дуракова О.С., Громова О.В., Киреев М.Н., Воробьева С.А., Клокова О.Д., Ливанова Л.Ф., Белякова Н.И., Волох О.А. Применение дот-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2018; 14(4):10–3.

References

1. Cholera vaccines: WHO position paper – August 2017. [Internet]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258764/1/WER9234-477-498.pdf>.
2. WHO – Weekly Epidemiological Record. Cholera, 2020. 17 September 2021. No. 37. Vol. 96. P. 445–60. [Internet]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/345267/WER9637-eng-fre.pdf>.
3. Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Komissarov A.V., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Nikiforov A.K., Livanova L.F., Volokh O.A., Lobovikova O.A., Bronnikova V.S. [Methods and technologies of *Vibrio cholerae* cultivation (scientific review)]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (4):95–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-95-101.
4. Holmgren J. Modern history of cholera vaccines and the pivotal role of icddr.b. *J. Infect. Dis.* 2021; 224(12 Suppl. 2):S742–S748. DOI: 10.1093/infdis/jiab423.
5. Shaikh H., Lynch J., Kim J., Excler J.L. Current and future cholera vaccines. *Vaccine*. 2020; 38(Suppl. 1):A118–A126. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.12.011.
6. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV edition. Moscow; 2018.
7. Antonycheva M.V., Nizhegorodtsev S.A., Eremin S.A., Alenkina T.V., Shul'gina I.V., Vakhrushina N.I., Belousov A.D., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K. [Nutrient medium for submerged cultivation of *Vibrio cholerae*]. RF Patent No. 2425866, publ. August 10, 2011. Bull. No. 22.
8. Durakova O.S., Gromova O.V., Livanova L.F., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Gaeva A.V., Kireev M.N., Volokh O.A. [Modern approaches to isolation and purification of cholera test-toxin]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2018; 3(1):59–62. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-59-62.
9. Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Aleshina Yu.A., Eremin S.A., Vasin Yu.G., Klokova O.D., Belyakova N.I., Krainova A.G. [Method for concentrating native cholero-gen-anatoxin and O-antigen of *Vibrio cholerae* O1 classical biovar of the strain 569B, serovar Inaba]. Patent No. 2451522, publ. May 27, 2012. Bull. No. 15.
10. Durakova O.S., Gromova O.V., Kireev M.N., Vorob'eva S.A., Klokova O.D., Livanova L.F., Belyakova N.I., Volokh O.A. [The use of dot-immunoassay to determine the specific activity of antigens in the production of cholera vaccine]. *Vestnik Biotekhnologii i Fiziko-Khimicheskoy Biologii im. Yu.A. Ovchinnikova. [Bulletin of Biotechnology and Physical-Chemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov]*. 2018; 14(4):10–3.

Authors:

Vol'nikov V.R., Durakova O.S., Salikhov R.R., Samokhvalova Yu.I., Avdeeva N.G., Klokova O.D., Kireev M.N., Volokh O.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Вольников В.Р., Дуракова О.С., Салихов Р.Р., Самохвалова Ю.И., Авдеева Н.Г., Клокова О.Д., Киреев М.Н., Волох О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.