

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-15-19

УДК 616.9:616-097

М.Н. Киреев, О.В. Громова, С.В. Борисова, С.А. Воробьева, В.Р. Вольников, Р.Р. Салихов, О.А. Волох

Биотехнологический потенциал антигенов возбудителей чумы, холеры, туляремии и сибирской язвы, полученных в институте «Микроб»

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

Во ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора разрабатываются и внедряются методы получения и очистки биологически активных веществ возбудителей чумы, холеры, туляремии и сибирской язвы, которые используются при конструировании профилактических и диагностических препаратов. **Цель** обзора – обобщение и систематизация накопленных данных по выделению, очистке и анализу антигенов и токсинов возбудителей чумы, холеры, туляремии и сибирской язвы. Также уделено внимание применению и перспективам использования полученных антигенов для конструирования медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). Институт «Микроб» является референс-центром по чуме, поэтому современные иммунодиагностические препараты необходимы и востребованы. Профилактические препараты антигенного уровня против перечисленных выше инфекций также являются предметом изучения сотрудников института. Основные этапы выделения, очистки и анализа антигенов включают в себя выбор или конструирование подходящего штамма, культивирование, экстракцию, концентрирование и очистку антигенов и токсинов с применением биотехнологических методов, позволяющих получить и сохранить интересующее исследователя биологически активное вещество. Для изучения антигенной активности очищенных антигенов используют лабораторных животных, фиксируют и анализируют иммунный ответ, получают антисыворотку. Затем следует этап анализа физико-химических и иммунобиологических свойств выделенных антигенных препаратов и составление паспорта антигена. Охарактеризованные антигены используются для конструирования профилактических и диагностических препаратов.

Ключевые слова: антигены *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*.

Корреспондирующий автор: Киреев Михаил Николаевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Киреев М.Н., Громова О.В., Борисова С.В., Воробьева С.А., Вольников В.Р., Салихов Р.Р., Волох О.А. Биотехнологический потенциал антигенов возбудителей чумы, холеры, туляремии и сибирской язвы, полученных в институте «Микроб». *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 2:15–19. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-15-19

Поступила 09.11.2023. Принята к публ. 17.04.2024.

M.N. Kireev, O.V. Gromova, S.V. Borisova, S.A. Vorob'eva, V.R. Vol'nikov, R.R. Salikhov, O.A. Volokh

Biotechnological Potential of Antigens of Plague, Cholera, Tularemia and Anthrax Pathogens, Obtained at the Russian Research Institute “Microbe”

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe” of the Rospotrebnadzor develops and implements methods for obtaining and purifying biologically active substances of the causative agents of plague, cholera, tularemia and anthrax, which are used in the design of preventive and diagnostic preparations. **The aim** of the review is to summarize and systematize the accumulated data on the isolation, purification and assessment of antigens and toxins of plague, cholera, tularemia and anthrax pathogens. Attention is also paid to the application and prospects for using the obtained antigens for the design of medical immunobiological preparations (MIBPs). The Institute “Microbe” is a reference center for plague, hence modern immunodiagnostic drugs are necessary and in demand. Antigen-level preventive drugs against the infections listed above are also the subject of study by the institute’s staff. The main stages of isolation, purification and analysis of antigens include the selection or construction of a suitable strain; cultivation, extraction, concentration and purification of antigens and toxins using biotechnological techniques that allow for obtaining and preserving the biologically active substance of interest to the researcher. To study the antigenic activity of purified antigens, laboratory animals are involved, the immune response is recorded and analyzed, and antiserum is obtained. This is followed by the stage of investigating the physicochemical and immunobiological properties of the isolated antigen preparations and drawing up an antigen profile. The characterized antigens are used for the design of preventive and diagnostic drugs.

Key words: *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, antigens.

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

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

Corresponding author: Mikhail N. Kireev, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kireev M.N., Gromova O.V., Borisova S.V., Vorob'eva S.A., Vol'nikov V.R., Salikhov R.R., Volokh O.A. Biotechnological Potential of Antigens of Plague, Cholera, Tularemia and Anthrax Pathogens, Obtained at the Russian Research Institute “Microbe”. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 2:15–19. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-15-19

Received 09.11.2023. Accepted 17.04.2024.

Kireev M.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3059-4386>
Gromova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0172-2964>
Borisova S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3793-6526>
Vorob'eva S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3624-0850>

Vol'nikov V.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0791-895X>
Salikhov R.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4980-4109>
Volokh O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>

Во ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора накоплен большой опыт по получению антигенов возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии и холерного вибриона. Разработаны или усовершенствованы методы их выделения, очистки и модификации, подобраны и оптимизированы способы определения антигенной и ферментативной активности. Это позволяет проектировать и конструировать профилактические и диагностические препараты современного уровня.

В резолюциях ежегодных пленумов Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации неоднократно отмечалась необходимость разработки новых вакцинных препаратов с повышенной эффективностью, сниженной реактогенностью, конструирования и внедрения в практику здравоохранения новых препаратов для лабораторной диагностики особо опасных инфекций. Молекулярные исследования антигенов возбудителей инфекционных болезней позволят целенаправленно изменять свойства биомолекул при конструировании медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). На решение этих вопросов направлены научно-исследовательские и опытно-конструкторские разработки.

Для чумного микроба это такие антигены, как капсульный антиген (F1), углеводсодержащие антигены, липополисахарид (ЛПС), полисахарид (ПС), основной соматический антиген (ОСА), активатор плазминогена (Pla), аллерген пестин (ПП), транспортные белки, белки внешней мембраны (Omp) [1–8].

Изучена стабильность компонентов экспериментальной химической чумной вакцины в условиях длительного хранения в рефрижераторе и в экстремальных температурных условиях (тесты на ускоренное старение и стресс-условия). Полученные результаты свидетельствуют о выраженной термостабильности специфических биополимерных структур антигенных компонентов F1 и ОСА, ответственных за иммунобиологическую активность химической чумной вакцины, что, на наш взгляд, является важной характеристикой этого прототипа химической чумной вакцины.

Антигены чумного микроба использовали для многих научно-практических разработок: конструирование биологического микрочипа для выявления специфических антител к возбудителю чумы, создание способа специфической индикации возбудителя методом оптической спектроскопии [9, 10].

Капсульный антиген F1 применяли для конструирования иммуносуспензионных диагностикумов для выявления специфических антител чумного микроба в дот-иммуноанализе и ИФА-диагностикума [11]. Также он используется как модельный компонент при конструировании прототипа трансдермального варианта вакцин [12].

В рамках выполнения ряда научно-исследовательских работ и государственных контрактов получены экспериментальные и практические данные о выделении, очистке и модификации антигенов чумного микроба, холерного вибриона и возбудителя

туляремии. Выделены и очищены ЛПС чумного микроба, нетоксичный полисахарид чумного микроба, О-антигены холерного вибриона сероваров Инаба, Огава и O139, холерный токсин, В-субъединица холерного токсина, протеовибрин (комплекс ферментов) холерного вибриона, липополисахарид возбудителя туляремии. К антигенам получены сыворотки и гибридомы, которые используются в научных исследованиях и при разработке профилактических и диагностических препаратов.

В Российской Федерации зарегистрирован и выпускается уникальный препарат – вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой [13, 14]. Данный иммунобиологический лекарственный препарат производится в отделе профилактических препаратов института «Микроб». Основные компоненты вакцины – анатоксин холерного токсина и О-антигены холерного вибриона различных серогрупп [15–17]. В настоящее время проводится работа по внедрению в производственный процесс и включению в регламент по выпуску вакцины инструментальных методов контроля, позволяющих заменить тесты на лабораторных животных анализом *in vitro*.

В институте «Микроб» разработана экспериментальная технология получения антитоксического энтеросорбента для интраинтестинальной нейтрализации экзотоксина холерного вибриона. Данный препарат состоит из иммобилизованного на микрочастицах хитозана антитоксического противохолерного иммуноглобулина, выделенного из сыворотки крови животных, иммунизированных холерным токсином. Полученный иммуноэнтеросорбент стабилизирован лиофильным высушиванием с последующим формированием лекарственной формы энтеросорбента для направленной сорбции холерного экзотоксина. На полученную лекарственную форму оформлен патент [18].

На антигены холерного вибриона получены кроличьи сыворотки. Проведены межлабораторные комиссионные испытания экспериментальных серий сывороток кроличьих к О-антигенам холерного вибриона Огава, Инаба и к В-субъединице холерного токсина. Установлено, что все исследованные сыворотки обладают высокой специфической активностью и могут быть использованы при конструировании тест-систем и диагностикумов для контроля содержания антигенных компонентов в вакцине холерной химической таблетированной.

На основе выделенного и очищенного О-антигена получены иммуноглобулины и разработан препарат – иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные O139 адсорбированные кроличьи, лиофилизат для диагностических целей. Иммуноглобулины предназначены для выявления и идентификации возбудителя холеры O139-серогруппы в мазках из различных материалов и чистых культур прямым методом флуоресцирующих антител.

При получении О-антигенного компонента холерной бивалентной химической вакцины остается

побочный продукт, в котором содержится комплекс низкомолекулярных биологически активных ферментов, среди которых преобладают протеаза, фосфолипазы A₂ и C. Из этого отхода получен и изучен ферментный комплекс холерного вибриона, названный авторами протеовибрином, который обладает активностью в отношении достаточно широкого спектра белковых субстратов, не уступая коммерческому трипсину, а в ряде случаев превосходит его по ферментативной активности [19]. Данное свойство протеовибрина было использовано в биотехнологии получения полисахарида чумного микроба с низкой токсичностью [20]. Другим важным направлением использования протеовибрина является первичный гидролиз белкового сырья в приготовлении микробиологических сред. Данный препарат применен в качестве трипсиноподобного агента, близкого по действию к поджелудочной железе, для ферментативного гидролиза казеина и пекарских дрожжей, традиционно используемых в качестве питательной основы при производстве холерных вакцин [21].

Разработаны методические подходы к культивированию туляремиального микроба и получению его антигенов и антигенных комплексов: ЛПС, протективный антигенный комплекс (ПАК), комплекс Bfr-O-антиген, стрессовые белки (Bfr, GroEl/GroEs, HSP) [22–24]. На ЛПС туляремиального микроба получены моноклональные антитела и сконструирована экспериментальная туляремиальная дот-иммуоферментная тест-система («ДИАТул-М»), которая прошла лабораторные и полевые испытания и зарегистрирована [25]. Продемонстрирована иммуногенность конъюгатов протективных антигенных комплексов туляремиального микроба с наночастицами золота [26]. Выделен и всесторонне охарактеризован комплекс Bfr-O-антигена *Francisella tularensis*, показана потенциальная возможность его практического использования при конструировании прототипа химической туляремиальной вакцины. При изучении влияния стрессовых условий на жизнеспособность возбудителя туляремии и экспрессию стрессовых антигенов электрооптическим методом показано, что условия культивирования оказывают значительное влияние на жизнеспособность микробных клеток и уровень экспрессии антигенов. Электрооптический мониторинг функционального состояния клеток возбудителя туляремии при культивировании позволит смоделировать оптимальные условия получения биомассы с максимальным выходом антигенов. Такие данные крайне необходимы при масштабном получении компонентов вакцин или антигенов для диагностических целей.

В последние годы получены, очищены и охарактеризованы антигены сибирской язвы: протективный антиген, антигены S-слоя (Sap, EAI) [27]. Создан прототип химической сибиреязвенной вакцины и экспериментальные иммунодиагностические препараты на основе рекомбинантного протективного антигена и белков S-слоя сибиреязвенного микроба. В ходе работы над данной тематикой разработан биологически безопасный и эффективный способ масшта-

бируемого получения высокоочищенных антигенов сибиреязвенного микроба – протективного антигена и белка S-слоя (EAI), необходимых для создания химических вакцин. Разработан способ, предусматривающий возможность их выделения в одной технологической цепочке, состоящей из этапов культивирования, стерилизующей фильтрации, концентрирования, диафильтрации и хроматографической очистки. В качестве продуцента протективного антигена и белка EAI сибиреязвенного микроба предложен аспорогенный, авирулентный генно-инженерный штамм *B. anthracis* 55ΔTPA-1Spo⁻ [28].

Большинство полученных, очищенных и изученных антигенных препаратов лиофилизированы и в условиях хранения при температуре 2–8 °C сохраняют свои свойства не менее 5 лет (срок наблюдения). В тестах на ускоренное старение и в стресс-условиях антигены чумного микроба стабильно сохраняли свои характеристики [29]. На полученные и изученные биологически активные вещества составлены паспорта с основными биологическими, физико-химическими, биохимическими и иммунохимическими характеристиками. К большинству антигенов получены сыворотки и иммуноглобулины. В настоящее время проводятся исследования данных антигенов с использованием высокотехнологического научного оборудования: масс-спектрометрии, инфракрасной Фурье-спектроскопии, электронной и атомно-силовой микроскопии [30–34].

В институте «Микроб» разработаны и используются в работе методы получения и очистки биологически активных веществ возбудителей чумы, холеры, туляремии и сибирской язвы. Нарботанные и охарактеризованные антигены применяются в работе научных и экспериментально производственных подразделений института при проектировании, конструировании и производстве профилактических и диагностических препаратов. Методы выделения и очистки антигенов оформлены в виде методических рекомендаций, отражены в публикациях, авторские методики запатентованы. Информация, представленная в статье, будет полезна для специалистов, исследователей, научных сотрудников, занимающихся изучением и конструированием профилактических и диагностических препаратов, а также подготовкой и апробацией средств для контроля МИБП на этапах их производства.

Дальнейшая работа в этом направлении будет посвящена разработке электронного реестра антигенов, который позволит объединить в одном виртуальном ресурсе накопленные данные об антигенах особо опасных инфекций, их составе, способах и методах их выделения и очистки, результатах биохимического и иммунохимического анализа.

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

- Бахрах Е.Э., Вейнблат В.И. Соматические полисахарид-содержащие антигены чумного микроба. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1972; 3:12–6.
- Вейнблат В.И., Дальвадянец С.М., Веренков М.С. Методы получения и очистки капсульного антигена и эндотоксина возбудителя чумы. *Лабораторное дело*. 1983; 12:37–9.
- Тараненко Т.М., Гольдфарб Л.М., Наумов А.В., Андреева И.П. Ускоренный метод выявления структурных особенностей липополисахарида по наличию альдогептозы у бактерий чумы и псевдотуберкулеза. *Лабораторное дело*. 1982; 2:46–7.
- Сердобинцев Л.Н., Тараненко Т.М., Веренков М.С., Наумов А.В. Получение капсульного антигена методом одно-этапной гелевой фильтрации. В кн.: Вопросы профилактики природно-очаговых инфекций. Саратов; 1983. С. 37–41.
- Гусева Н.П., Кравцов А.Л., Киреев М.Н., Тараненко Т.М., Шмелькова Т.П. Липополисахарид чумного микроба как индуктор апоптоза лимфоцитов крови и перитонеальных макрофагов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2003; 86:117–23.
- Щербачев А.А., Заднова С.П., Коннов Н.П. Анализ препарата мембранных белков чумного микроба иммунохимическими методами. В кн.: Молекулярная биология и микробиология природно-очаговых инфекций. Саратов; 1986. С. 93–100.
- Видяева Н.А., Кутырев В.В., Проценко О.А., Олейников П.Н., Анисимов П.И. Экспрессия антигенов чумного микроба, кодируемых плазмидой Са2+-зависимости. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 1990; 6:17–21.
- Микеров А.Н., Емельянова Н.В., Назарова Л.С., Видяева Н.А., Кутырев В.В. Действие на мышей препаратов белков Уор, кодируемых плазмидой кальцийзависимости *Yersinia pestis*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2000; 6:70–6.
- Спицын А.Н., Уткин Д.В., Киреев М.Н., Шарапова Н.А., Ерохин П.С., Германчук В.Г., Кочубей В.И. Оптическая регистрация образования иммунных комплексов с использованием наночастиц коллоидного золота. *Оптика и спектроскопия*. 2018; 125(5):716–20. DOI: 10.21883/OPT.2018.11.46848.199.
- Уткин Д.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К., Волох О.А. Способ изготовления биологических микроматриц для выявления генетических и белковых маркеров. Патент РФ № 2792447, опубл. 22.03.2023.
- Бойко А.В., Киреев М.Н., Осина Н.А., Куклев В.Е. Композитный чумной антигенный F1-диагностикум для индикации специфических антител. Патент РФ № 2582941, опубл. 27.04.2016. Бюл. № 12.
- Киреев М.Н., Волох О.А., Никифоров А.К. Композиты на основе природных биополимеров: свойства и перспективы применения при создании трансдермальных форм вакцин. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 1:70–2.
- Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Мелешенко М.В., Никитина Г.П. Способ получения пероральной химической вакцины. Патент РФ № 2076734, опубл. 10.04.1997.
- Волох О.А., Шепелёв И.А., Заднова С.П., Крепостнова И.М., Еремин С.А. Изучение биокинетических особенностей и оптимизация условий культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов протективных антигенов, перспективных для внедрения в производство. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008; 1:52–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-1(95)-52-55.
- Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Космаенко О.М. Способ получения О-антигена холерного очищенного. Патент РФ № 2143280, опубл. 27.12.1919.
- Захарова Т.Л., Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Киреев М.Н., Смирнова Н.И. Использование рекомбинантных штаммов для одновременного получения нескольких очищенных основных протективных антигенов холерного вибриона. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009; 2:68–71. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-2(100)-68-71.
- Дыкман Л.А., Волох О.А., Громова О.В., Дуракова О.С., Воробьева С.А., Киреев М.Н., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К., Щеголев С.Ю., Кутырев В.В. 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.
- Овчинникова М.В., Абрамова Е.Г., Киреев М.Н., Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Кутырев В.В. Энтеросорбент для направленной сорбции холерного экзотоксина, лекарственная форма энтеросорбента для направленной сорбции холерного экзотоксина. Патент РФ № 26113556, опубл. 21.02.2017. Бюл. № 6.
- Кузьмиченко И.А., Киреев М.Н., Громова О.В., Бронникова В.С., Нижегородцев С.А. Гидролизующая способность протеазы ферментного комплекса холерного вибриона – протеовибрина по отношению к белковым субстратам. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008; 4:37–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-4(98)-37-39.
- Полунина Т.А., Гусева Н.П., Кузьмиченко И.А., Девдариани З.Л., Заднова С.П., Степанов А.В., Киреев М.Н. Способ получения липополисахарида возбудителя чумы. Патент РФ № 2483112, опубл. 27.05.2013. Бюл. № 15.
- Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Плотников О.П., Грачева И.В., Виноградова Н.А., Солодовников Н.С., Червякова Н.С., Нижегородцев С.А., Антонычева М.В. Способ получения питательной основы и питательная среда для культивирования микроорганизмов рода *Yersinia* и *Vibrio*. Патент РФ № 2360962, опубл. 10.07.2009.
- Кузнецова Е.М., Волох О.А., Шепелёв И.А., Никифоров А.К. Компонентный состав протективного антигенного комплекса туляремиального микроба. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2012; 3:22–5.
- Кузнецова Е.М., Волох О.А., Краснов Я.М., Полунина Т.А., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Баданин Д.В., Киреев М.Н., Германчук В.Г., Никифоров А.К. Комплекс Bft-O-антиген внешних мембран *Francisella tularensis*: получение, характеристика, возможности использования. *Биотехнология*. 2019; 35(1):73–81. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-73-81.
- Борисова С.В., Волох О.А., Кожеников В.А., Кравцов А.Л., Никифоров А.К. Динамика показателей иммунитета биомодели, иммунизированных стресс-белками *Francisella tularensis*. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2023; 19(3):6–13.
- Терешкина Н.Е., Терехова И.В., Сырова Н.А., Девдариани З.Л., Ляшова О.Ю., Григорьева Г.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Иваненко И.Л., Захарова Н.Б., Безрукова Г.А., Спирин В.Ф. Конструирование и медицинские испытания моноклональной дот-иммуноферментной тест-системы для детекции туляремиального микроба «ДИАТул-М». *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2:42–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-42-45.
- Дыкман Л.А., Волох О.А., Кузнецова Е.М., Никифоров А.К. Иммуногенность конъюгатов протективных антигенных комплексов туляремиального микроба с наночастицами золота. *Российские нанотехнологии*. 2018; 13(7-8):36–43.
- Микши Н.И., Семакова А.П., Попова П.Ю., Кудрявцева О.М., Бугоркова С.А., Комиссаров А.В., Германчук В.Г., Попов Ю.А. Определение соответствия прототипа рекомбинантной сибирезавязанной вакцины требованиям, предъявляемым к иммунобиологическим препаратам. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(3):388–92.
- Микши Н.И., Попов Ю.А., Шулепов Д.В. Аспорогенный рекомбинантный штамм *Bacillus anthracis* 55ΔTPA-1SpO (pUB110PA-1)-продуцент протективного антигена сибирезавязанного микроба. Патент РФ № 2321629, опубл. 10.04.2008.
- Киреев М.Н., Тараненко Т.М., Храменкова Т.А., Гусева Н.П., Полунина Т.А., Павлова В.И., Подборонова Н.А., Девдариани З.Л., Голова А.Б., Дальвадянец С.М. Изучение стабильности антигенных компонентов чумной химической вакцины (F1+OCA) в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009; 1:70–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-1(99)-70-74.
- Гаева А.В., Громова О.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Волох О.А. Современные подходы к контролю активных компонентов холерной химической вакцины. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018; 1:152–7.
- Гаева А.В., Громова О.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Ливанова Л.Ф., Волох О.А. Определение специфической активности компонентов холерной химической вакцины с использованием культуры клеток. *Биотехнология*. 2020; 36(3):82–9.
- Громова О.В., Киреев М.Н., Дуракова О.С., Ливанова Л.Ф., Гаева А.В., Воробьева С.А., Волох О.А. Способ получения холерного токсина для контроля производства холерной химической вакцины. Патент РФ № 2799574, опубл. 06.07.2023. Бюл. № 19.
- Воробьева С.А., Дуракова О.С., Волох О.А., Громова О.В. 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):318–9. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319.
- Германчук В.Г., Уткин Д.В., Спицын А.Н., Киреев М.Н., Щербачев Н.Е. Индикация холерного токсина с помощью MALDI масс-спектрометрии. *Здоровье населения и среда обитания – 3HuCO*. 2015; 3:27–31.

References

- Bakhrakh E.E., Veinblat V.I. [Somatic polysaccharide-containing antigens of the plague microbe]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology]*. 1972; (3):12–6.
- Veinblat V.I., Dal'vadyants S.M., Verenkov M.S. [Methods for obtaining and purifying capsular antigen and endotoxin of the plague pathogen]. *Laboratornoe Delo [Laboratory Work]*. 1983; (12):37–9.

3. Taranenko T.M., Goldfarb L.M., Naumov A.V., Andreeva I.P. [An express method for identifying the structural features of lipopolysaccharide by the presence of aldoheptose in plague and pseudotuberculosis bacteria]. *Laboratornoe Delo [Laboratory Work]*. 1982; (2):46–7.
4. Serdobintsev L.N., Taranenko T.M., Verenkov M.S., Naumov A.V. [Production of capsular antigen using one-step gel filtration]. In: [Issues of Prevention of Natural-Focal Infections]. Saratov; 1983. P. 37–41.
5. Guseva N.P., Kravtsov A.L., Kireev M.N., Taranenko T.M., Shmel'kova T.P. [Plague microbe lipopolysaccharide as an inducer of apoptosis of blood lymphocytes and peritoneal macrophages]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2003; (86):117–23.
6. Shcherbakov A.A., Zadnova S.P., Konnov N.P. [Analysis of preparation of the plague microbe membrane proteins using immunochemical methods]. In: [Molecular Biology and Microbiology of Natural-Focal Infections]. Saratov; 1986. P. 93–100.
7. Vidyayeva N.A., Kut'yev V.V., Protchenko O.A., Oleynikov P.N., Anisimov P.I. [Expression of plague microbe antigens encoded by the Ca2+-dependence plasmid]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 1990; (6):17–21.
8. Mikerov A.N., Emel'yanova N.V., Nazarova L.S., Vidyayeva N.A., Kut'yev V.V. [Effect of Yop protein preparations encoded by the *Yersinia pestis* calcium dependence plasmid on mice]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology]*. 2000; (6):70–6.
9. Spitsyn A.N., Utkin D.V., Kireev M.N., Sharapova N.A., Erokhin P.S., Germanchuk V.G., Kochubey V.I. [Optical registration of the formation of immune complexes using colloidal gold nanoparticles]. *Optika i Spektroskopiya [Optics and Spectroscopy]*. 2018; 125(5):716–20. DOI: 10.21883/OS.2018.11.46848.199.
10. Utkin D.V., Kireev M.N., Nikiforov K.A., Volokh O.A. [A method for producing biological microarrays for identifying genetic and protein markers]. RF Patent No. 2792447, publ. 03/22/2023.
11. Boiko A.V., Kireev M.N., Osina N.A., Kuklev V.E. [Composite plague antigen F1 diagnosticum for indicating specific antibodies]. RF Patent No. 2582941, publ. 04/27/2016. Bull. No. 12.
12. Kireev M.N., Volokh O.A., Nikiforov A.K. [Composites based on natural biopolymers: properties and prospects for use in the creation of transdermal forms of vaccines]. *Razrabotka i Registratsiya Lekarsvennykh Sredstv [Development and Registration of Medicinal Products]*. 2016; (1):70–2.
13. Dzhariparidze M.N., Naumov A.V., Meleshchenko M.V., Nikitina G.P. [Method for producing an oral chemical vaccine]. RF Patent No. 2076734, publ. 04/10/1997.
14. Volokh O.A., Shepelev I.A., Zadnova S.P., Krepostnova I.M., Eremin S.A. [A study of biokinetic peculiarities and optimization of the conditions for culturing *Vibrio cholerae* strains over-producing protective antigens suitable for use in the production]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2008; (1):52–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-1(95)-52-55.
15. Gromova O.V., Dzhariparidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Kosmaenko O.M. [Method for obtaining purified cholera O-antigen]. RF Patent No. 2143280, publ. 12/27/1919.
16. Zakharova T.L., Zadnova S.P., Livanova L.F., Kireev M.N., Smirnova N.I. [Recombinant strains application for simultaneous preparation of several purified cholera vibrio antigens]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2009; (2):68–71. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-2(100)-68-71.
17. Dykman L.A., Volokh O.A., Gromova O.V., Durakova O.S., Vorob'eva S.A., Kireev M.N., Livanova L.F., Nikiforov A.K., Shchegolev S.Yu., Kut'yev V.V. [Production and characterization of antibodies to protective antigens of *Vibrio cholerae* conjugated with gold nanoparticles]. *Reports of the Russian Academy of Sciences. Life Sciences*. 2020; 490(1):27–30. DOI: 10.31857/S2686738920010084.
18. Ovchinnikova M.V., Abramova E.G., Kireev M.N., Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Kut'yev V.V. [Enterosorbent for targeted sorption of cholera exotoxin, dosage form of enterosorbent for targeted sorption of cholera exotoxin]. RF Patent No. 26113556, publ. 02/21/2017. Bull. No. 6.
19. Kuz'michenko I.A., Kireev M.N., Gromova O.V., Bronnikova V.S., Nizhegorodtsev S.A. [Hydrolyzing ability of protease of enzyme complex of cholera vibrio that is proteovibrin for protein substrates]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2008; (4):37–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-4(98)-37-39.
20. Polunina T.A., Guseva N.P., Kuz'michenko I.A., Devdariani Z.L., Zadnova S.P., Stepanov A.V., Kireev M.N. [Method for producing plague pathogen lipopolysaccharide]. RF Patent No. 2483112, publ. 05/27/2013. Bull. No. 15.
21. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Plotnikov O.P., Gracheva I.V., Vinogradova N.A., Solodovnikov N.S., Chervyakova N.S., Nizhegorodtsev S.A., Antonycheva M.V. [Method for obtaining a nutrient base and nutrient medium for cultivating microorganisms of the genus *Yersinia* and *Vibrio*]. RF Patent No. 2360962, publ. 07/10/2009.
22. Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Shepelev I.A., Nikiforov A.K. [Component composition of the protective antigenic complex of tularemia microbe]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2012; (3):22–5.
23. Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Krasnov Ya.M., Polunina T.A., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Badanin D.V., Kireev M.N., Germanchuk V.G., Nikiforov A.K. [*Francisella tularensis* outer membrane complex Bfr-O-antigen: preparation, characteristics, possibilities of use]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2019; 35(1):73–81. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-73-81.
24. Borisova S.V., Volokh O.A., Kozhevnikov V.A., Kravtsov A.L., Nikiforov A.K. [Dynamics of immunity parameters of biotransformants immunized with *Francisella tularensis* stress proteins]. *Bulletin of Biotechnology and Physical-Chemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov*. 2023; 19(3):6–13.
25. Tereshkina N.E., Terekhova I.V., Syrova N.A., Devdariani Z.L., Lyashova O.Yu., Grigorieva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V., Ivanenko I.L., Zakharova N.B., Bezrukova G.A., Spirin V.F. [Constructing and medical trials of a monoclonal dot-immuno-enzyme test-system "DIATul-M" for tularemia microbe detection]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (2):42–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-42-45.
26. Dykman L.A., Volokh O.A., Kuznetsova E.M., Nikiforov A.K. [Immunogenicity of conjugates of protective antigenic complexes of the tularemia microbe with gold nanoparticles]. *Rossiiskie Nanotekhnologii [Russian Nanotechnologies]*. 2018; 13(7-8):36–43.
27. Mikshis N.I., Semakova A.P., Popova P.Yu., Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A., Komissarov A.V., Germanchuk V.G., Popov Yu.A. [Determination of compliance of the recombinant anthrax vaccine prototype with the requirements for immunobiological preparations]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2018; 8(3):388–92.
28. Mikshis N.I., Popov Yu.A., Shulepov D.V. [Asporogenous recombinant strain of *Bacillus anthracis* 55ΔTPA-1Sp0-(pUB110PA-1), producer of the protective antigen of anthrax microbe]. RF Patent No. 2321629, publ. 04/10/2008.
29. Kireev M.N., Taranenko T.M., Khranchenkova T.A., Guseva N.P., Polunina T.A., Pavlova V.I., Podboronova N.A., Devdariani Z.L., Golova A.B., Dal'vadyants S.M. [Analysis of stability of plague chemical vaccine (F1+MSA) antigenic components in the tests of accelerated ageing and stress conditions]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2009; (1):70–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-1(99)-70-74.
30. Gaeva A.V., Gromova O.V., Durakova O.S., Generalov S.V., Volokh O.A. [Modern approaches to the control of active components of cholera chemical vaccine]. *Razrabotka i Registratsiya Lekarsvennykh Sredstv [Development and Registration of Medicinal Products]*. 2018; (1):152–7.
31. Gaeva A.V., Gromova O.V., Durakova O.S., Generalov S.V., Livanova L.F., Volokh O.A. [Determination of the specific activity of cholera chemical vaccine components using cell culture]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2020; 36(3):82–9.
32. Gromova O.V., Kireev M.N., Durakova O.S., Livanova L.F., Gaeva A.V., Vorob'eva S.A., Volokh O.A. [Method for obtaining cholera toxin to control the production of cholera chemical vaccine]. RF Patent No. 2799574, publ. 07/06/2023. Bull. No. 19.
33. Vorob'eva S.A., Durakova O.S., Volokh O.A., Gromova O.V. [Possibility of determining the specific activity of O-AG in the production of cholera chemical vaccine using dot analysis]. *Izvestiya Saratovskogo Universiteta. Novaya Seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya [Bulletin of Saratov University. New series. Series: Chemistry. Biology. Ecology]*. 2018; 18(3):318–9. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319.
34. Germanchuk V.G., Utkin D.V., Spitsyn A.N., Kireev M.N., Shcherbakova N.E. [Indication of cholera toxin using MALDI mass spectrometry]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2015; (3):27–31.

Authors:

Kireev M.N., Gromova O.V., Borisova S.V., Vorob'eva S.A., Vol'nikov V.R., Salikhov R.R., Volokh O.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Киреев М.Н., Громова О.В., Борисова С.В., Воробьева С.А., Вольников В.Р., Салихов Р.Р., Волох О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.