

УДК 616.932:615.

Определение специфической активности компонентов холерной химической вакцины с использованием культуры клеток

© 2020 А.В. ГАЕВА^{1,*}, О.В. ГРОМОВА¹, О.С. ДУРАКОВА¹, С.В. ГЕНЕРАЛОВ¹, Л.Ф. ЛИВАНОВА¹, О.А. ВОЛОХ¹

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Саратов 410005

*e-mail: rusrap1@microbe.ru

Поступила в редакцию 26.11.2019 г.

После доработки 16.03.2020 г.

Принята к публикации 15.05.2020 г.

Описаны методы определения динамики продукции токсинов штаммом *Vibrio cholerae* 569В при глубинном культивировании в биореакторе и антигенной активности специфической фракции холерогена-анатоксина по анатоксинсвязыванию с использованием клеточных культур. Показана высокая степень соответствия результатов, полученных методами, применяемыми для контроля этапов производства холерной химической вакцины и рассмотренными в данной работе. Отмечено, что применение клеточной линии *CHO-K1* наиболее перспективно для замены биомоделей на промежуточных этапах контроля активных компонентов холерной химической вакцины. Разработанный методический подход впервые предлагается использовать на этапах производства холерной бивалентной химической вакцины.

Ключевые слова: культура клеток, *Vibrio cholerae*, холерная химическая вакцина, контроль производства, холера.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-82-89

Холера – особо опасная инфекционная болезнь с диарейным синдромом, фекально-оральным механизмом передачи возбудителя инфекции, водным, пищевым и контактными путями распространения. Заносы инфекции остаются основными эпидемиологическими рисками в распространении холеры на глобальном, региональных и национальных уровнях. Возможность заноса инфекции в Россию является реальной и диктует необходимость обеспечения выполнения в полном объеме мероприятий, предусмотренных действующими СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой в Российской Федерации». В системе противоэпидемических мероприятий по борьбе с холерой большое значение придается профилактической вакцинации. В 2001 году в

России вакцинация против холеры была включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям (Приказ Минздрава России № 229 от 27.07.2001) [1,2].

Современное производство вакцин, как и других иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), должно осуществляться производителями лекарственных средств, имеющими лицензию на производство лекарственных средств, в соответствии с Правилами надлежащей производственной практики («Good Manufacture Practice» – GMP). Правила GMP распространяются на все виды лекарственных средств и устанавливают общие требования к организации их производства и контроля качества. Отечественные принципы GMP для фармацевтической отрасли регламентированы национальным стандартом ГОСТ Р 52249-2009

Список сокращений: АЕ – антитоксическая единица; АХС – антихолерогенная сыворотка; ЕС – единица связывания; ИФА – иммуноферментный анализ; сыворотка КРС – сыворотка крови крупного рогатого скота; ИЛП – иммунобиологический лекарственный препарат; РДП – реакция диффузной преципитации; РПИГ – реакция пассивного иммунного гемолиза; СОП – стандартный образец предприятия; ХТ – холерный токсин, GMP – Good Manufacture Practice.

«Правила производства и контроля качества лекарственных средств». Стандарт распространяется на все категории лекарственных средств и прописывает общие требования к их изготовлению и контролю качества, а также конкретные требования к производству активных фармацевтических субстанций и отдельных видов лекарственных препаратов. Безопасность вакцин оценивается системой из пяти уровней контроля, один из которых, контроль качества вакцин на предприятии-изготовителе, предусматривает обязательный поэтапный контроль материала на безопасность на разных стадиях технологического процесса (контроль исходного сырья, полуфабриката, готовой продукции) [3].

В России разработана, зарегистрирована и выпускается оральная химическая бивалентная таблетированная холерная вакцина, в состав которой входят холероген-анатоксин и О-антигены холерного вибриона сероваров Инаба и Огава.

При производстве холерной химической вакцины используются токсигенные штаммы *V. cholerae*. Как правило, токсигенность холерных вибрионов и активность холерного токсина (ХТ) в большинстве лабораторий определяют на новорожденных кроликах, в лигированных петлях тонкой кишки взрослых кроликов и внутрикожной пробе по Крейгу. При производстве холерной химической вакцины на промежуточных стадиях производства (контроль специфических фракций), используют общепринятые методы проверки токсичности на нескольких видах лабораторных животных [3,4]. Активность холерного токсина тестируется в соответствии с нормативными документами на производство методом кожной пробы по Крейгу, иммунохимическими методами РПИГ (реакция пассивного иммунного гемолиза) и РДП (реакция диффузной преципитации). Основным компонентом вакцины холероген-анатоксин получают из формализованного безмикробного центрифугата штамма *Vibrio cholerae* 569В. Качество холероген-анатоксина определяется специфической активностью холерного токсина. Количество холерогена-анатоксина в таблетках вакцины определяется по специфической активности антигена в реакции анатоксинсвязывания. Активность анатоксина выражается в единицах связывания (ЕС). ЕС – количество анатоксина, которое целиком связывается с 1 АЕ (антитоксической единицей) антитоксической сыворотки. Классический метод нейтрализации, проводимый на животных для определения специфической активности анатоксинов по стандартной антитоксической сыворотке (дифтерийной, столбнячной и др.), весьма трудоемок, длителен, сложен в постановке [5]. На конечный результат оказывают влия-

ние значительные колебания индивидуальной чувствительности кожи кроликов.

Биологические методы с использованием лабораторных животных до сих пор являются незаменимыми при оценке вирулентности штаммов, позволяют оценить биологическую активность препаратов токсинов и интенсивность их продукции микроорганизмами. В то же время в литературных источниках приводятся результаты исследований, свидетельствующие о возможности использования альтернативных моделей, таких как перевиваемые клеточные культуры [6, 7, 8]. Поскольку в работах используются стандартные среды и референтные клеточные линии, данные методы воспроизводимы. Установлено, что эти тесты высокочувствительны и сопоставимы с разрешающей способностью биопробы [9, 10]. В мире накоплен большой объем информации о преимуществах этих методов как наиболее технологичных, объективных, точных и удовлетворяющих требованиям биоэтики. Для оценки биологической активности токсинов холерного вибриона исследованы культуры клеток различных линий (*CHO-K1*, *CaCo2*, *L-929*, *HeLa*, *McCoy*, *Vero*, *MDCK*, *Hep-2*, *Y1*) [11,12,13]. Наиболее чувствительной линией в отношении ХТ является культура *CHO-K1*, позволяющая выявлять до 20–30 пг/мл токсина, в то же время наиболее приближенной моделью к условиям *in vivo* является культура эпителиальных клеток тонкого кишечника человека *CaCo2*, образующая монослой, подобные нормальному эпителию кишечника [6, 7, 14]. Чаще всего в работе с холерным токсином используют клеточные линии *Vero*, *CHO-K1*, *Y1* [15].

Цель настоящего исследования – разработка методического подхода для контроля специфических активных компонентов на этапах производства холерной химической вакцины с использованием перевиваемых клеточных линий.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм *V. cholerae* 569В получен из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Клеточная линия *Vero* (клетки почки африканской зеленой маргитки) получена из коллекции ООО «Биолот» (Россия); клеточная линия *CHO-K1* (овариальные клетки китайского хомяка) получена из Российской коллекции культур клеток позвоночных института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург).

Тест-токсин холерный получен методом, описанным Mekalanos J.J. et al. и состоящем в осаждении белка из культуральной жидкости при низком

значении pH и последующей очистке ионообменной хроматографией, основанной на способности белка холерогена связываться с катионообменными смолами при pH 7,0 [16].

Холероген-анатоксин получен из инактивированной формалином бульонной культуры *V. cholerae* O1 классического биовара штамма 569В серовара Инаба в соответствии с технологическими операциями нормативного документа: осаждение серноокислым аммонием с последующим центрифугированием; диализ; стерилизация и сублимационное высушивание.

Приготовление монослоя клеточной культуры

Клетки линии *СНО-К1* выращивали в среде Игла и 199 (1:1 об./об.) с добавлением 10% сыворотки КРС, клетки линии *Vero* выращивали в среде 199 с добавлением 10% сыворотки КРС по общепринятой методике с соблюдением условий асептики.

Суспензию клеток готовили из предварительно выращенной трехсуточной клеточной культуры. Культивирование клеточной культуры осуществляли в полистироловых культуральных флаконах с площадью рабочей поверхности 25 см². Качество клеточного монослоя контролировали при помощи инвертированного микроскопа. Для открепления клеток от поверхности использовали 0,25% раствор трипсина и 0,02% раствор версена (соотношение 1:2 об./об). Открепившиеся клетки суспендировали в 10 мл питательной среды (соответствующей для каждого вида клеток). Эту процедуру повторяли не менее 20 раз. Во все лунки планшетов добавляли по 100 мкл клеточной суспензии и планшеты инкубировали в CO₂ – инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 37 °С и 5% CO₂ в течение 18–24 ч.

Определение активности холерного токсина

В работе использовали фильтраты бульонной культуры штамма холерного вибриона *Vibrio cholerae* 569В Инаба из 16 реакторов. Бульонную культуру *V. cholerae* 569В выращивали в биореакторе глубинным методом с аэрацией. Для получения стерильного супернатанта бульонной культуры и последующего определения его активности, взятую из реактора по окончании выращивания пробу в количестве 50 мл центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 мин на центрифуге Sigma (Германия) и фильтровали через фильтрующие элементы с диаметром пор 0,22 мкм. Подготовку образцов проводили согласно СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

В работе применяли 96 луночные планшеты. Посевная доза составила 1·10³ клеток на лунку.

После формирования монослоя в лунках, питательную среду заменяли на 100 мкл свежей, не содержащей сыворотки. В первые лунки каждого ряда добавляли исследуемые образцы фильтрата бульонной культуры, разведенные 1:10 в питательной среде, по 100 мкл в концентрации 40–60 мкг белка на лунку; содержание белка в образцах определяли по Лоури. Далее образцы титровали до конца ряда по 100 мкл, получая двукратные разведения с конечным объемом 100 мкл.

Параллельно с исследуемыми пробами титровали стандартный препарат холерного токсина (положительный контроль), смесь образца и антихолерогенной сыворотки (АХС) с ранее установленным титром (1:1) после 30 мин инкубации при температуре 37 °С для подтверждения специфичности действия образцов на клеточную культуру. Планшет закрывали и помещали в CO₂ – инкубатор (Sanyo) при температуре 37 °С и 5% CO₂.

Морфологическое изучение культур проводили через 18–20 ч с помощью инвертированного микроскопа. Клетки предварительно окрашивали по Романовскому-Гимзе. Активность ХТ оценивали путем подсчета процентного содержания измененных клеток в лунке. Произвольно выбирали три поля зрения по 100 клеток. За токсическую концентрацию принимали ту концентрацию токсина, которая вызывала специфические изменения у 50% наблюдаемых клеток: удлинение, деформацию, появление разветвленных отростков. Активность ХТ выражали либо в мкг/лунка, либо в титрах.

Определение специфической активности сухого холерогена-анатоксина по анатоксинсвязыванию

Для постановки реакции брали по 3 пробы образца сухого холерогена-анатоксина. Готовили раствор с концентрацией белка 1 мг/мл, который затем разводили в 0,9% растворе натрия хлорида до получения разведений 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000, 1:10000, 1:12000, 1:14000.

К 0,2 мл раствора каждого разведения добавляли по 0,2 мл СОП (стандартного образца предприятия) сыворотки антихолерогенной кроличьей, разведенной до 80 АЕ/мл. Пробирки встряхивали и помещали на 30 мин в термостат при температуре 37 °С. Далее в каждую пробирку вносили по 0,4 мл СОП (стандартного образца предприятия) тест-токсина холерного, разведенного до 20 опытных доз в 1 мл. Пробирки встряхивали и помещали на 30 мин в термостат при температуре 37 °С.

В лунки планшета со сформировавшимся монослоем вносили образцы по 100 мкл, начиная с последнего разведения 1:14000. Определение активности холерогена-анатоксина проводили на

3 планшетах, по 2 ряда на каждую пробу. Специфичность действия подтверждали определением 1 антитоксической единицы (1 АЕ) сыворотки антихолерогенной. Для этого готовили разведения сыворотки антихолерогеной в 0,9% растворе натрия хлорида, содержащие 80 АЕ, 60 АЕ, 40 АЕ, 30 АЕ, 20 АЕ в 1 мл. К 0,2 мл каждого разведения добавляли 0,2 мл 0,9% раствора натрия хлорида и 0,4 мл СОП токсина, содержащего 20 опытных доз в 1 мл, получая соответственно концентрацию 2 АЕ, 1,5 АЕ, 1 АЕ, 0,75 АЕ, 0,5 АЕ разведения АХС в 0,1 мл. Смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С и вносили в лунки параллельно с исследуемыми образцами по 100 мкл, начиная с 2 АЕ. Планшеты помещали в СО₂ – инкубатор при температуре 37 °С и 5% СО₂.

В качестве положительного контроля использовали рабочее разведение стандартного образца тест-токсина холерного, в качестве отрицательного контроля – интактные клетки *СНО-К1*. Морфологическое изучение культур проводили аналогично описанному выше. Положительным считали результат в лунках, где концентрация оставшегося (не связанного с антихолерогенной сывороткой) токсина вызывает специфические изменения у 50% наблюдаемых клеток: удлинение, деформация, появление разветвленных отростков. Последние лунки с положительным результатом на всех планшетах учитывали как показатели разведения препарата, соответствующее его специфической активности, например, 1:8000. Рассчитывали среднее арифметическое значение разведений (в трех повторностях) для каждой фракции.

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием стандартного пакета программы Microsoft Office Excel 2010.

Наличие взаимосвязи между результатами определения специфической активности, полученными разными методами, оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исторически сложилось, что токсикологическая экспертиза проводится на основании исследований на теплокровных животных (мыши, крысы, кролики, морские свинки, ребе – собаки, кошки, обезьяны) [18, 19]. Эксперименты с использованием животных крайне важны для сохранения здоровья человека, хотя они являются трудоемкими и дорогостоящими, а подопытные животные травмируются и гибнут. В связи с этим сегодня вполне обоснован поиск альтернативных моделей и тест-систем в условиях *in vitro*, исполь-

зование которых снимает целый ряд этических проблем, возникающих при использовании большой группы животных [20].

В настоящее время актуальным вопросом производства холерной химической вакцины является усовершенствование методов контроля.

Одним из этапов контроля при производстве холерной химической вакцины является качественная и количественная характеристика содержания холерного токсина в бульонной культуре производственного штамма при глубинном культивировании. По данному показателю оценивают возможность дальнейшего проведения производственного цикла. Токсичность бактериальных антигенов изучается как на лабораторных животных *in vivo*, так и в условиях *in vitro* на моделях различных клеток, в частности, культурах перевиваемых клеточных линий. Введение в практику методов контроля с использованием клеточных культур может обеспечить значительное сокращение использования животных в производстве холерной химической вакцины.

В данной работе была изучена активность холерного токсина в образцах фильтрата бульонной культуры (по 8 реакторов) на двух клеточных линиях *Vero* и *СНО-К1*.

Для определения цитотоксичности полученных образцов токсина на клетки линии *Vero* исследовали изменение общей морфологии, лизис, нарушение монослоя и т.п. Содержание белка в исследуемых образцах №№ 1–8 составило около 6 мг/мл, кроме образцов № 4 и № 6, содержащих 12 и 10 мг/мл соответственно (табл. 1). Все образцы вызывали специфическое изменение клеток: удлинение, деформация, появление разветвленных отростков (рис. 1).

Определено, что наименее активным по всем тестам был образец № 7, а наиболее токсичным для линии клеток *Vero* оказался образец № 1, в то время как его активность по Крейгу и в РПИГ не отличалась от большинства образцов. При сопоставлении результатов с данными, полученными при проведении контроля в соответствии с нормативными документами на производство (кожная проба по Крейгу, РПИГ) определен коэффициент корреляции Пирсона – 0,1, что указывает на статистически не значимую, слабую корреляцию. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Содержание белка в исследуемых образцах холерного токсина №№ 9–16 составило около 4 мг/мл. При изучении их активности на линии клеток *СНО-К1* установлено, что низкая специфическая активность образца № 11, определяемая по методу Крейга (1:24000) и РПИГ (1:16) подтверждается и на модели линии клеток *СНО-К1*

Результаты определения активности холерного токсина из образцов фильтрата бульонной культуры штамма *V. cholerae* 569B на перевиваемой линии клеток *Vero*, в РПИГ и внутрикожной пробы по Крейгу
Results of determination of cholera toxin activity from samples of the broth culture filtrate from the strain *V. cholerae* 569B on the *Vero* cell line, in RPIG and intradermal Craig test

№ образца	Количество белка по Лоури, мг/мл	Активность ХТ по Крейгу, титр	Активность ХТ в РПИГ, титр	Активность ХТ на модели линии клеток <i>Vero</i>	
				мкг/лунка	титр
1	5,7	1:24000	1:64	0,46	1:1280
2	5,9	1:24000	1:64	0,94	1:640
3	5,7	1:32000	1:64	1,87	1:320
4	12	1:192000	1:256	1,87	1:640
5	6,0	1:64000	1:64	0,94	1:640
6	10	1:192000	1:512	1,60	1:640
7	6,3	1:2000	1:8	3,75	1:160
8	6,2	1:192000	1:256	0,87	1:320

(1:80). В образце № 12, показавшем высокую активность ХТ по методу Крейга (1:128000), РПИГ (1:128), на модели линии клеток *CHO-K1* также определен высокий титр (1:1280), при содержании белка 0,32 мкг на лунку. Результаты анализа активности изученных образцов на культуре клеток *CHO-K1* приведены в табл. 2. Установлено, что данные по активности холерного токсина в исследованных образцах фильтратов бульонной культуры, полученные биологическим, иммунохимическим методами и с использованием линии клеток *CHO-K1* сопоставимы, коэффициент корреляции Пирсона составил 0,8 и 0,7 соответственно. По литературным данным, как указывалось выше (стр. 3), наиболее чувствительной линией в отношении ХТ является культура клеток *CHO-K1*, позволяющая выявлять до 20–30 пг/мл токсина [6]. Это, а также специфическое удлинение клеток данной линии (рис. 2) [21] под действием холерного токсина послужило основанием выбора линии клеток *CHO-K1* для нашей дальнейшей работы.

Для определения антигенной активности специфической фракции холероген-анатоксина по ЕС на культуре клеток *CHO-K1* нами проведено исследование 8 образцов параллельно с регламентным методом на производство вакцины холерной химической (с использованием кроликов). Реакция анатоксинсвязывания (нейтрализации) заключается в том, что разведения холероген-анатоксина специфически связываются с сывороткой антихолерогенной, при этом не связавшееся количество сыворотки нейтрализуется введенным в реакцию третьим компонентом (тест-токсин холерным). Не прореагировавшее количество тест-токсина оказывает специфическое действие: у кроликов наблюдается положительная кожная реакция (зона отека от 5 до 10 мм), а у клеток линии *CHO-K1* прослеживается специфическое удлинение (положительным засчитывали результат в лунках, где наблюдали удлинение у 50% клеток). Специфическая фракция холероген-анатоксина штамма *V. cholerae* 569B считается пригодной для

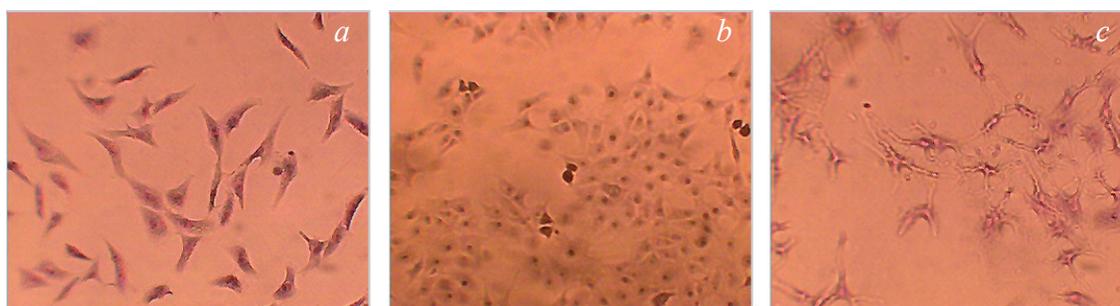


Рис. 1. Действие холерного токсина на культуру клеток *Vero* (x100): *a* – контроль отрицательный (интактные клетки), *b* – контроль специфичности, *c* – влияние образца супернатанта бульонной культуры на клетки.

Fig. 1. Effect of cholera toxin on *Vero* cell culture (x100): *a* – negative control (intact cells), *b* – specificity control, *c* – effect of broth culture supernatant sample on cells.

Таблица 2

Результаты определения активности холерного токсина из образцов фильтрата бульонной культуры штамма *V. cholerae* 569В на перевиваемой линии клеток *CHO-K1*, в РПИГ и внутрикожной пробы по Крейгу

Results of determination of cholera toxin activity from samples of the broth culture filtrate from the strain *V. cholerae* 569В on the *CHO-K1*, in RPIG and intradermal Craig test

№ образца	Количество белка по Лоури, мг/мл	Активность ХТ по Крейгу, титр	Активность ХТ в РПИГ, титр	Активность ХТ на модели линии клеток <i>CHO-K1</i>	
				мкг/лунка	титр
9	4,0	1:32000	1:256	0,63	1:640
10	3,8	1:64000	1:512	0,60	1:640
11	4,5	1:24000	1:16	5,00	1:80
12	4,0	1:128000	1:128	0,32	1:1280
13	3,8	1:48000	1:128	0,63	1:640
14	4,3	1:32000	1:256	0,63	1:640
15	4,0	1:32000	1:256	0,63	1:640
16	4,0	1:32000	1:256	1,25	1:320

Таблица 3

Результаты специфической активности по анатоксинсвязыванию холерогена-анатоксина методами *in vivo* и *in vitro*

Results of specific activity by anatoxin-binding of cholero-gen-anatoxin both *in vivo* and *in vitro*

№ образца	Активность холерогена-анатоксина по ЕС <i>in vivo</i> (кролики), титр	Активность холерогена-анатоксина по ЕС <i>in vitro</i> (культура клеток <i>CHO-K1</i>), титр
1	1:4000	1:6000
2	1:4000	1:4000
3	1:6000	1:6000
4	1:6000	1:6000
5	1:6000	1:8000
6	1:8000	1:10000
7	1:4000	1:6000
8	1:8000	1:8000

дальнейшего формирования таблеток вакцины холерной при наличии специфической активности от 2000 до 12000 ЕС в 1 мг фракции при тестировании на кроликах. В результате исследования установлено, что значения специфической активности фракции холерогена-анатоксина по анатоксинсвязыванию с помощью культуры клеток имеют положительную корреляцию с данными, полученными при использовании регламентного метода нейтрализации, проводимого на животных для определения специфической активности холерогена-анатоксина путем постановки внутрикожной пробы по Крейгу (табл. 3). Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,8.

Таким образом, проведена работа по оценке возможного использования перевиваемых клеточных линий при производстве холерной химической вакцины – для оценки активности холерного токсина и определения антигенной активности

специфической фракции холероген-анатоксина. В результате показана высокая степень соответствия полученных результатов между методами, применяемыми при производстве холерной химической вакцины и рассмотренными в данной работе. Следует отметить, что применение клеточной линии *CHO-K1* наиболее перспективно для замены биомоделей на промежуточных этапах контроля активных компонентов холерной химической вакцины. Клетки линии *CHO-K1* являются стандартной моделью для изучения токсичности веществ, чувствительность цитологического метода превосходит серологический (ИФА) в 20–40 раз, при этом клетки данной линии на воздействие холерного токсина реагируют специфическим изменением формы клеток – удлинением [6, 7, 21]. Использование клеточной линии *Vero* менее пригодно, поскольку отмечается меньшая чувствительность клеток данной линии к воздействию ХТ.

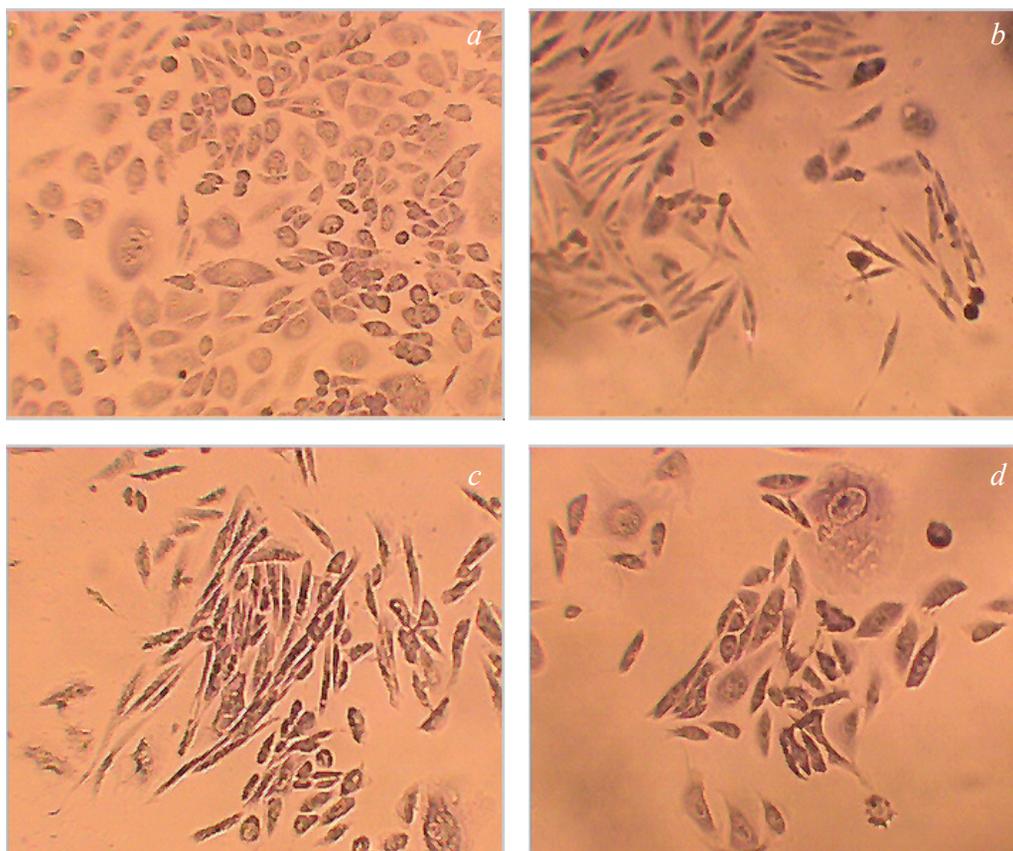


Рис. 2. Культура клеток *CHO-K1* (x100): *a* – контроль отрицательный (интактные клетки), *b* – контроль положительный (холерный токсин), *c* – влияние образца № 12 на клетки, *d* – контроль специфичности (АХС + образец № 12).

Fig. 2. Cell culture *CHO-K1* (x100): *a* – negative control (intact cells), *b* – positive control (cholera toxin), *c* – effect of sample No 12 on cells, *d* – specificity control (ATS + sample No 12).

В связи с вышеизложенным, замена методов определения специфической активности ХТ на биомоделях при производстве холерной химической вакцины на высокочувствительные, воспроизводимые, простые в постановке методы *in vitro* является актуальной задачей и определяет необходимость их внедрения в производственный процесс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В. и др. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008-2017 гг. Прогноз на 2018 г. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2018, (1), 36–43. doi: 10.21055/0370-1069-2018-1-36-43
2. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., и др. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, 2016, (1), 89–101. doi: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. ГФ РФ, XIV издание, М., 2018.
4. Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006.
5. Okabe L. On a method of the standardization of anti-diphtheria serum by the use of tissue cultivation. *Kitasato Archive of experimental Medicine*, 1933, 10, 41–56.
6. Сальникова О.И., Алексеева Л.П., Подосинникова Л.С., и др. Чувствительность культуры клеток СНО и ТИФА при тестировании холерного токсина *in vitro*. *Холера и патогенные для человека вибрионы*. Сборник материалов проблемной комиссии Научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. Ростов-на-Дону, 1999, 12, 83–84.
7. Сальникова О.И., Маркина О.В., Мазрухо А.Б., и др. Оценка токсинпродуцирующей активности штаммов холерного вибриона, выделенных при вспышке холеры в Казани в 2001 году, на модели культуры клеток СНО-К1 и ИФА-2АТ. *Холера и патогенные для человека вибрионы*. Сборник материалов проблемной комиссии Научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. Ростов-на-Дону, 2002, 15, 41–42.

8. Маркина О.В., Алексеева Л.П., Монахова Е.В. Культуры клеток в изучении биологической активности токсинов *Vibrio cholerae*, продуцируемых рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*. *Холера и патогенные для человека вибрионы*. Сборник материалов проблемной комиссии Научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. Ростов-на-Дону, 2006, 19, 91–93.
9. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. М: Бином. Лаборатория знаний, 2010, 714.
10. Пименова Е.В., Храпова Н.П. Изучение потенциальной токсичности антигенов *Burkholderia pseudomallei* на модели перевиваемых клеточных культур. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2015, (7), 247–250.
11. О.И. Сальникова. Культура клеток в изучении и тестировании токсинов холерного вибриона: автореф. дис. канд. биол. наук. Саратов, 1994.
12. Маркина О.В., Монахова Е.В., Алексеева Л.П., Писанов Р.В. Изучение биологического действия гемагглютинин/протеазы холерных вибрионов на модели культур клеток. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2007, (94), 58–61.
13. Jin D., Luo U., Zheng M., et al. Quantitative detection of *Vibrio cholerae* toxin by real-time and dynamic cytotoxicity monitoring. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(12), 3968–3974. doi: 10.1128/JCM.01959-13.
14. Pinto M., Robine-Leon S., Appay M.D. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line CaCo-2 cells in culture. *Biol. Cell*, 1983, 47, 323–330.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory methods for the diagnosis of *Vibrio cholera*. Atlanta, Georgia: CDC, 2011, 63–69.
16. Mekalanos J.J., Collier R.J., Roming W.R. Purification of cholera toxin and its subunits: new methods of preparation and the use of hypertoxinogenic mutants. *Infect. Immun.*, 1978, 20(2), 552–558.
17. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов М.: Высш. шк., 1990, 352.
18. Общая токсикология [Под редакцией Б.А. Курляндского, В.А. Филова]. М: Медицина, 2002, 608.
19. Трахтенберг И.М., Тимофеевская Л.А., Квятковская И.Я. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей [Под редакцией М. Трахтенберг]. Рига: Знание, 1987, 172.
20. Беляева Л.Л., Крючкова М.А., Танасева С.А., Семенов Э.И. Альтернативные методы исследования цитотоксичности микотоксинов. *Актуальные вопросы в научной работе и образовательной деятельности: сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции 30 апреля 2014 г.*, Тамбов: ООО «Консалтинговая компания Юком», 2014, 163.
21. Guerrant R.L., Brunton L.L., Schnaitman T.C., et al. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese Hamster Ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 1974, 10(2), 320–327.

Determination of Specific Activity of Cholera Chemical Vaccine Components using Cell Culture

A.V. GAEVA^{1,*}, O.V. GROMOVA¹, O.S. DURAKOVA¹, S.V. GENERALOV¹, L.F. LIVANOVA¹, and O.A. VOLOKH¹

¹Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Saratov, 410005

*e-mail: rusrapi@microbe.ru

Received November 26, 2019

Revised March 16, 2020

Accepted May 15, 2020

Abstract—The methods has been described to determine the dynamics of toxin production by the *Vibrio cholerae* 569B strain during submerged cultivation in bioreactor and of the antigenic activity of specific cholera toxin fraction by anatoxin binding levels using cell cultures. High degree of consistency was observed between the results obtained via the method under consideration and those obtained via control methods at different stages of cholera chemical vaccine production. It was shown that the *CHO-K1* cell line is the most promising substitute for biomodels at the intermediate stages of control of active cholera chemical vaccine components. The developed methodological approach was first proposed for use at the stages of cholera chemical bivalent vaccine manufacturing.

Key words: cell culture, *Vibrio cholerae*, cholera chemical vaccine, production control, cholera.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-82-89