

УДК 616.932; 615.371

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К КОНТРОЛЮ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

А.В. Гаева^{1*}, О.В. Громова¹, О.С. Дуракова¹, С.В. Генералов¹, О.А. Волох¹

Резюме. В обзоре рассмотрены требования к производству лекарственных веществ, современные направления в тестировании токсичности получаемых препаратов. Приведены результаты исследований использования клеточных линий для оценки биоактивных веществ, в том числе и холерного токсина. Оценены преимущества использования методов *in vitro*, в частности применения перевиваемых клеточных линий на этапах производства холерной химической вакцины.

Ключевые слова: вакцины, токсигенность, культура клеток.

MODERN APPROACHES TO THE CONTROL OF ACTIVE COMPONENTS OF CHOLERA CHEMICAL VACCINE

A.V. Gaeva^{1*}, O.V. Gromova¹, O.S. Durakova¹, S.V. Generalov¹, O.A. Volokh¹

Abstract. The paper considers the requirements to the production of pharmaceutical substances and the current trends in the toxicity assessment of the preparations obtained. The results of research of the use cell cultures for test bioactive substances, including cholera toxin are given. Evaluated are the advantages of *in vitro* methods application, in particular, continuous cell lines at some stages of cholera chemical vaccine manufacturing.

Keywords: vaccines, toxigenicity, cell culture.

1 – ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

1 – Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rosпотребнадзор, 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: rusrapi@microbe.ru
Тел.: 8 (8452) 26 21 31

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в практическом здравоохранении применяются вакцины, разработанные много лет назад, но усовершенствованные по мере развития медицинской науки. Усовершенствование вакцин обусловлено необходимостью повышения их безопасности, переносимости и эффективности.

Основные типы вакцин, лицензированных для клинического использования, содержат живые ослабленные, убитые или инактивированные микроорганизмы. Меньшее количество препаратов основано на очищенных компонентах микроорганизмов, а совсем немногочисленная группа – на белках, синтезированных с помощью метода рекомбинантных ДНК [1].

Современное производство вакцин, как и других медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП), должно основываться на соблюдении санитарных правил СП 3.3.2.015-94 «Производство и контроль медицинских иммунобиологических препаратов для обеспечения их качества» – документа, соответствующего за-

рубежным Good Manufacture Practice (GMP). Этот нормативный документ включает комплекс требований к производству и контролю МИБП, гарантированно обеспечивающих их активность, безопасность и стабильность, и распространяется на все предприятия, производящие МИБП. 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) [2].

Основным нормативным документом, определяющим требования к качеству МИБП и методы его контроля, является фармакопейная статья (ФС), утверждаемая Министерством здравоохранения РФ. Фармакопейная статья, являющаяся государственным стандартом, содержит требования, предъявляемые ВОЗ к биологическим продуктам, что позволяет осуществлять выпуск отечественных препаратов на уровне мировых стандартов.

Документом, определяющим технологию производства МИБП, является регламент производства препарата (РП), который согласовывается с контролирующей организацией.

Требования к безопасности испытуемого препарата касаются подтверждения безвредности и отсутствия токсичности, токсигенности и вирулентности. Для определения безопасности испытуемого препарата используют биологические методы *in vivo*.

Проведение теста на безвредность позволяет выявить негативные воздействия испытуемого препарата на организм животного. Контроль препарата по данному показателю является обязательным при отборе и хранении производственных штаммов, отработке новых технологий производства лекарственного средства, при предварительном и сертификационном контроле, при оценке качества и проверке стабильности лекарственных форм в процессе установления срока годности [3].

Холерная химическая вакцина, разработанная в РосНИПЧИ «Микроб» и лицензированная на территории России, состоит из холерогена-анатоксина и О-антигенов холерного вибриона сероваров Инаба и Огава. Актуальным вопросом производства вакцин остается усовершенствование методов контроля. Вакцинный штамм должен быть проверен на остаточную вирулентность и токсигенность по комплексу тестов *in vivo* и *in vitro*. К числу тестов *in vivo* относятся определение вирулентности на модели кроликов-сосунков; определение остаточной токсигенности (выявление фактора сосудистой проницаемости и дерматонекротического фактора) в кожной пробе; определение остаточной токсигенности в лигированных петлях тонкого кишечника взрослых кроликов; определение остаточной токсигенности, реактогенности и приживаемости штамма при внутрижелудочном заражении взрослых кроликов [4]. На промежуточных стадиях производства вакцины (контроль полуфабрикатов, готовой продукции) используют общепринятые методы проверки токсичности на лабораторных животных. Качество полуфабриката холерогена-анатоксина определяется специфической активностью холерного токсина, которая тестируется в соответствии с промышленным регламентом на производство методом кожной пробы по *Craig*, иммунохимическими методами РПИГ и GM₁-ELISA. Количество холерогена-анатоксина в таблетках вакцины определяется по специфической активности антигена в реакции анатоксина-связывания. В данных реакциях, а также для получения антихолерогенной сыворотки используется холерный токсин. На многих этапах производства холерной вакцины используют несколько видов лабораторных животных. В то же время в литературных источниках приводятся результаты исследований, свидетельствующие

о возможности использования альтернативных методов, таких как применение перевиваемых клеточных культур [5–7].

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ *IN VITRO*: АКТУАЛЬНОСТЬ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МОДЕЛИ

Исторически сложилось, что токсикологическая экспертиза проводится на основании данных острых, подострых, хронических и других специальных исследований на теплокровных животных (мыши, крысы, кролики, морские свинки, реже – собаки, кошки, обезьяны) [8, 9].

Эксперименты с использованием животных являются трудоемкими и дорогостоящими, в результате подопытные животные травмируются и гибнут. Однако эти исследования крайне важны для сохранения здоровья человека.

В связи с этим сегодня вполне обоснованы разработки ученых, направленные на максимальное сокращение количества животных и замену их альтернативными моделями и тест-системами в условиях *in vitro*.

В 1959 году микробиолог R. Birch и зоолог W. Russel в Лондоне издали книгу «The principle of humane experimental technique», в которой сформулирована концепция «трех R» (Replacement, Reduction, Refinement). В книге отражены общепризнанные принципы гуманного использования животных в исследовательских и образовательных целях. Сегодня концепция «трех R» является самой передовой в области научных исследований. В данной теории Replacement означает замену на методы, позволяющие получить результаты без проведения экспериментов на животных. Reduction включает методические подходы, позволяющие получать сравнительную информацию при использовании меньшего числа животных либо большее количество данных на том же количестве животных. Refinement включает методы, исключающие или вызывающие минимальную боль, страдания и стресс у животных. Благодаря этой концепции удалось привлечь внимание к данной проблеме академических центров, что привело к существенному изменению техники исследований, испытаний и обучения с пользой как для науки, здоровья общества и образования, так и в интересах защиты экспериментальных животных [10–12].

Всемирная организация здравоохранения, международное медико-биологическое общество настоятельно рекомендуют и поддерживают использование альтернативных моделей и методов. Сегодня вопросы этического, разумного и экономного использования животных в исследованиях в области медицины, био-

логии и ветеринарии привлекают все большее внимание специалистов и общественности. Использование альтернативных методов *in vitro* снимает целый ряд этических проблем, возникающих при использовании большой группы животных. Кроме того, что эксперименты на животных не всегда обеспечивают результаты, которые можно экстраполировать на людей [13].

Одним из важных и необходимых этапов при отборе бактериальных антигенов в качестве возможных компонентов химических вакцин является изучение их токсических свойств. Токсичность – комплекс явлений, среди которых могут быть прямое повреждение клеток (как в случае цитотоксического действия противораковых препаратов), физиологические эффекты (мембранный транспорт в почках, нейротоксичность в мозге), воспалительное действие (как местное, так и общее). Большинство исследований определяют токсическое действие на клеточном уровне – цитотоксичность. Определения цитотоксичности разнообразны: в зависимости от природы исследования, а также от того, убивает препарат клетки или просто изменяет их метаболизм [14].

Современные научные технологии создают широкие возможности для использования в токсикологических исследованиях альтернативных методов на клеточном и молекулярном уровнях, которые заменяют классические методы определения опасности и оценки риска химических веществ. Показано, что они являются достаточно точными, простыми, перспективными, универсальными, экономически рентабельными [10, 15].

В качестве моделей *in vitro* используются системы различной биологической организации: беспозвоночные животные, гидробионты, микроорганизмы, растения, культуры клеток человека и животных, бесклеточные физико-химические тест-системы [11].

В настоящее время проводятся исследования по сравнению ряда генотипических, фенотипических и биологических методов определения активности различных токсинов (дифтерийный, холерный, микотоксины). Генетические методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяют выявить наличие в бактериях гена токсигенности, однако основной недостаток данных методов состоит в том, что они не дают информацию о способности микроорганизма к экспрессии биологически активного токсина. Поэтому ПЦР рекомендуется применять как дополнительный к фенотипическим тестам метод [16, 17].

Иммунохимические методы обнаружения и количественного анализа различных токсинов, в частности ИФА-системы, остаются наиболее используемыми, достоверными. На их основе разработаны коммерческие тест-системы, некоторые из них имеют высокую чувствительность [18, 19]. Проведен ряд

исследований по разработке наиболее удобных методов тестирования *in vitro* токсинов различных бактерий (*Corynebacterium diphtheriae*, *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio cholerae*). К таким тестам относятся варианты иммуноферментного анализа, тест с иммунохроматографическими полосками (ICS), тест иммунопреципитации Элека, тест с использованием метилтетразолиевого красителя (МТТ), показана корреляция результатов, полученных при использовании методов *in vivo* и *in vitro* [20, 21]. Для определения активности холерного токсина (ХТ) широко апробированным является метод иммуноферментного анализа. При этом наибольшей чувствительностью отличаются методы, связанные с использованием ганглиозидов GM₁, обладающих сродством к иммуногенной В-субъединице ХТ [22–25]. В качестве экспрессного метода при определении активности ХТ используется также метод радиального пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) на чашках. Данный метод отличается высокой чувствительностью, простотой и быстротой постановки [26]. Классический метод нейтрализации, проводимый на животных, весьма трудоемок, сложен в постановке, дорог по материальным затратам и занимает несколько дней [27].

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК В ИЗУЧЕНИИ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Для оценки потенциально токсичных биологических и химических веществ в настоящее время широко используют метод клеточной биоиндикации взамен общепринятой модели *in vivo*. Определение потенциальной токсичности антигенов возбудителей опасных инфекционных заболеваний *in vitro* на модели перевиваемых клеточных линий – чувствительный, простой в исполнении и информативный тест, который можно использовать на этапах лабораторного анализа различных внеклеточных или ассоциированных с клеточными структурами биополимеров. Установлено, что по чувствительности эти тесты сопоставимы с разрешающей способностью биопробы [14, 28, 29].

Культуры клеток представляют собой гомогенную популяцию генетически однородных клеток, растущих в постоянных условиях. Условия можно менять в определенных пределах, что позволяет оценивать влияние на рост клеток различных факторов: pH, температуры, концентрации аминокислот, витаминов и т.д. [14].

Так как клетки в культуре легко доступны для различных биохимических манипуляций, то при работе с ними вещества (яды, токсины, гормоны) могут быть введены в разной концентрации и в течение заданного количества времени.

Главным направлением использования клеточных культур представляется тестирование и изучение

механизма действия различных веществ, которые могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов, детергентов, косметических средств, инсектицидов, консервантов. Результаты, полученные на клеточных культурах, нельзя, безусловно, экстраполировать на целые организмы, тем не менее, если препарат оказывает повреждающее действие в нескольких линиях культивируемых клеток, то следует ожидать неблагоприятного эффекта и при введении этого вещества целому животному. Помимо того, что использование культур клеток избавляет от страданий большое количество животных, использование культур клеток человека позволяет оценивать повреждающее действие веществ у вида, недоступного для экспериментов такого рода, то есть у человека. Более того, результаты тестов оказываются более воспроизводимыми, когда они проводятся *in vitro* [30].

Для обеспечения системного подхода к оценке биологического действия изделий медицинского назначения, разрабатываемых для применения *in vivo*, в нашей стране введен в действие ГОСТ ISO 10993-5-2011 [31]. Стандарты этой серии являются руководящими документами для прогнозирования биологического действия медицинских изделий на стадии выбора материалов, предназначенных для их изготовления, а также для исследований готовых образцов.

Одним из преимуществ применения клеточных культур является возможность прижизненного наблюдения и оценка результатов взаимодействия компонентов сложных антигенных комплексов бактерий с клетками-мишенями по изменению морфофункциональных параметров клеток под действием потенциально токсических веществ [16, 32–34]. В мире накоплен большой объем информации о преимуществах этих методов как наиболее технологичных, объективных, точных и удовлетворяющих требованиям биоэтики.

Результаты исследований дифтерийного токсина, проведенных параллельно с помощью кожной пробы на кроликах и в культуре клеток Vero, оказались сопоставимы, вместе с тем реакция нейтрализации на культуре клеток проще, дешевле, доступнее, стандартнее и нагляднее, чем реакция нейтрализации на животных [35]. Однако результат и в этом же тесте можно получить лишь спустя несколько дней, что ограничивает его применение при проведении исследований в клинической лаборатории, где результат должен быть получен в минимально короткие сроки. В связи с этим в практической лабораторной практике преимущество получили тесты определения токсинопродукции в реакциях агглютинации, преципитации, а также при использовании иммуноферментных и генетических тест-систем. В работе Е.В. Пименовой (2015) [28] получены достоверные доказательства эффективнос-

ти использования перевиваемых клеточных линий CHO-K1 и L-929 для качественной и количественной оценки биологической активности растворимых антигенов *Burkholderia pseudomallei* в тесте микроцитотоксичности взамен общепринятого метода с использованием лабораторных животных.

Исследованы культуры клеток различных линий для оценки биологической активности токсинов холерного вибриона (CHO-K1, CaCo2, L-929, HeLa, McCoy, Vero, MDCK, Hep-2) [33, 36, 37]. Наиболее чувствительной линией в отношении ХТ является культура CHO-K1, позволяющая выявлять до 20–30 пг/мл токсина, в то же время моделью, наиболее приближенной к условиям *in vivo*, является культура эпителиальных клеток тонкого кишечника человека CaCo2, образующая монослой, подобные нормальному эпителию кишечника [5, 6, 38]. О.И. Сальникова с соавт. (2002) [33] показали, что оптимальными приемами тестирования токсина *in vitro* в бесклеточных супернатантах бульонных культур холерных вибрионов является сочетание двух высокочувствительных и специфичных методов: ИФА в варианте «двойных» антител на основе моноклональных антител к холерному токсину и кроличьей антитоксической сыворотки и титрование токсина в микрокультуре клеток CHO-K1.

Современные технологии позволяют разрабатывать новые альтернативные модели для токсикологических исследований. Так, система для клеточного анализа в режиме реального времени RTCA iCELLigence основана на микроэлектронных биосенсорах, которые позволяют динамически и в реальном времени анализировать клеточный ответ без использования дополнительных маркеров или меток. Прибор применяется для широкого диапазона клеточных исследований, в том числе для определения адгезии и прилегания клеток, пролиферации и дифференциации клеток, цитотоксичности различных компонентов и их влияния на апоптоз, рецепторной передачи сигнала, контроля качества клеток, цитопатогенных свойств вирусов. Система позволяет получать количественные результаты высокого качества, с высокой степенью точности, воспроизводимости. В работе D. Jin с соавт. (2013) [37] использовали четыре клеточные линии для определения цитотоксичности холерного токсина. При изучении 200 изолятов холерного вибриона выявлено изменение клеточной морфологии исключительно для образцов токсигенных штаммов. Применение метода ХТ-RTCA выявило чувствительность и специфичность 97,5% и 100% соответственно для штаммов холерного вибриона. Ранее эта система была использована для определения токсинов *Clostridium difficile* в качестве альтернативного определения цитотоксичности [37].

Способ оценки токсичности на одноклеточных организмах – инфузориях также используется в медицинских исследованиях, отличается достаточной

простотой и может применяться в любой санитарно-бактериологической лаборатории. Инфузории, будучи клеткой и организмом одновременно, позволяют оценить разнообразные воздействия как на клеточном, так и на более высоком организменном уровне. Описан метод определения токсичности на культуре инфузорий *Tetrachymena pyriformis* по степени задержки роста культуры под воздействием исследуемых антигенов чумы и холеры [39]. Получен патент на изобретение по определению токсической концентрации бактериального антигена по степени угнетения выделительной функции инфузорий [40].

Еще одно из направлений использования современных технологий в изучении токсических влияний возможных компонентов вакцин – разработка вариантов микробиореакторов. Микробиореакторы представляют собой микрофлюидные системы, содержащие модули для совместного культивирования нескольких органоспецифических клеточных линий (ОСКЛ) и моделирующие взаимодействия между ними в условиях близкого к физиологическому тока жидкости. Их применение является альтернативой традиционным методам скрининга с использованием клеточных культур и последующими доклиническими испытаниями на животных. С помощью клеточных культур может быть получена информация о терапевтических эффектах определенного соединения на целевую ткань, но не на весь организм в целом, а данные, полученные на животных моделях, не всегда могут быть экстраполированы на человека. Микробиореакторы, моделирующие физиологические взаимодействия между органами, позволяют проводить более эффективный скрининг лекарственных веществ и их комбинаций [41, 42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с принципом «три R» эксперименты на животных, как ожидалось, должны иметь тенденцию к сокращению по разным соображениям, в том числе этическим. Однако на практике эта тенденция не находит кардинального воплощения. По-прежнему, несмотря на значительный прогресс в использовании принципиально новых и тонких методов экспериментальных медико-биологических исследований, стандартные эксперименты *in vivo* остаются незаменимыми и наиболее релевантными для экстраполяции экспериментальных эффектов лекарственных средств на человека [43].

Традиционные тест-системы, такие как клеточные культуры *in vitro*, дают первичное представление об эффективности и токсичности вещества. Эти данные пока еще нуждаются в дальнейшей проверке на моделях животных, и на конечном этапе производства данные о безвредности и эффективности компонентов требуют проверки на моделях животных (*in vivo*).

Вместе с тем очевидны преимущество, целесообразность и даже вынужденная необходимость использования альтернативных методов исследования *in vitro*. В связи с вышеизложенным замена методов определения специфической активности ХТ на биомоделях при производстве холерной химической вакцины на высококачественные, воспроизводимые, простые в постановке методы *in vitro* является актуальной задачей и определяет необходимость их внедрения в производственный процесс.

ЛИТЕРАТУРА

1. J.B. Ulmer, U. Valley, R. Rappuoli. Vaccine manufacturing: challenges and solutions // Nature Biotechnology. 2006. URL: <http://www.cbio.ru/> doi:10.1038/nbt1261 (дата обращения 15.02.2018).
2. Н.В. Медуницын. Государственная система оценки безопасности вакцин // Инф. Бюл. Вакцинация. 2000. № 2(8). С. 3–4.
3. ОФС.1.7.2.0001.15. Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo* // Государственная фармакопея РФ. XIII изд.
4. Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006.
5. О.И. Сальникова, Л.П. Алексеева, Л.С. Подосинникова, В.В. Лобанов, А.В. Карагозова, О.В. Смирнова, А.Б. Мазрухо. 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. Вып. 12. С. 83–84.
6. О.И. Сальникова, О.В. Маркина, А.Б. Мазрухо, Л.М. Овсова, Л.П. Алексеева, Б.Л. Мазрухо, И.С. Шестиалтынова, Д.И. Каминский. Оценка токсинпродуцирующей активности штаммов холерного вибриона, выделенных при вспышке холеры в Казани в 2001 году, на модели культуры клеток СНО-K1 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. Вып. 15. С. 41–42.
7. О.В. Маркина, Л.П. Алексеева, Е.В. Монахова. 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. Вып. 19. С. 91–93.
8. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. – М: Медицина, 2002. 608 с.
9. И.М. Трахтенберг, Л.А. Тимофеевская, И.Я. Квятковская. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей / Отв. ред. М. Трахтенберг. – Рига: Знание. 1987. 172 с.
10. Н.Н. Дмитруха. Культура клеток как *in vitro* модель в токсикологических исследованиях // Medix Anti-Aging. 2013. № 3(33). С. 50–55.
11. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М. 2010. 344 с.
12. C.A. Schuppli, D. Fraser. The interpretation and application of the three Rs by animal ethics committee members // ATLA. 2005. V. 33. № 5. P. 487–500.

13. Л.Л. Беляева, М.А. Крючкова, С.А. Танасева, Э.И. Семенов. 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. Ч. 10. – Тамбов. 2014. 163 с.
14. Р.Я. Фрешни. Культура животных клеток: практическое руководство. – М: Бином. Лаборатория знаний, 2010. 714 с.
15. S. Cinelli, A. Falezza, C. Meli. Alternative methods in toxicology tests: *in vitro* toxicity // *Cytotechnology*. 1991. V. 5. № 1. P. 51–54.
16. М.Н. Дмитриева, И.М. Грубер, Н.А. Гаврилова, Н.Г. Титова, И.В. Яковлева, В.В. Свиридов. Оценка количества дифтерийного токсина и его активности разными тестами в динамике культивирования *Corynebacterium diphtheriae* PW8 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1999. № 2. С. 32–35.
17. Л.А. Краева, Т.М. Зимица, Г.Я. Ценева, А.В. Соловьев. Микротехнологии в экспресс-диагностике токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. № 2. С. 62–66.
18. Е.Э. Петрова, Р.Л. Комалева, О.Е. Лахтина, Л.В. Самохвалова, Н.А. Калинина, Н.С. Шошина, А.Ю. Рубина, М.А. Филиппова, Ю.В. Вертиев, Т.И. Валякина, Е.В. Гришин. Получение и характеристика моноклональных антител к холерному токсину // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35. № 3. С. 357–368.
19. U.S. Food, Drug Administration. Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens. Bacteriological Analytical Manual. 2001.
20. К.Х. Энглер, Д. Норн, Р.С. Козлов, И. Сельга, Т.Г. Глушкевич, М. Там, Р.С. Джорж, А. Эфстратиоу. Быстрые фенотипические методы определения дифтерийного токсина у клинических штаммов коринебактерий // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001. № 2. Т. 3. С. 156–163.
21. Г.Я. Ценева, Л.А. Краева, С.А. Габриелян, Е.Е. Щедеркина. Методы определения токсигенности у штаммов *Corynebacteriae diphtheriae* // Бюллетень ВШЦ СО РАМН. 2005. № 7 (45). С. 182–186.
22. Т.В. Бугоркова, С.А. Щербаклова, Н.И. Белякова, Г.В. Доброва. Иммуноферментный анализ для выявления протеаз холерных вибрионов при производстве химических вакцин // Диагности-
- ка, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: материалы юбилейной научной конференции, посвященной 70-летию НИИ микробиологии МО РФ. 30 ноября – 1 декабря 1998. – Киров. 1998. С. 291–292.
23. О.В. Маркина, Л.П. Алексеева. Иммуноферментные методы тестирования холерного токсина // Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник материалов проблемной комиссии Научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону. 2005. Вып. 18. С. 133–135.
24. Е.А. Михеева, З.Л. Девдариани, Н.А. Осина, Т.Л. Захарова. Получение и характеристика антителопродуцирующих гибридом или моноклональных иммуноглобулинов к энтеротоксину *Vibrio cholerae* // Биотехнология. 2014. № 3. С. 49–54.
25. О.С. Дуракова, А.В. Гаева, Л.Ф. Ливанова, О.В. Громова, О.А. Волох. Определение активности холерного токсина при выращивании производственно-штамма *Vibrio cholerae* 569В методами *in vitro* // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных. Материалы II Всероссийской научно-практической конференции (5–6 апреля 2017 г.). – Ставрополь. 2017. С. 299–300.
26. M.G. Bramucci, R.K. Holmes. Radial passive immune hemolysis assay for detection of heat labile enterotoxin produced by individual colonies of *Esherichia coli* or *Vibrio cholerae* // Journal of Clinical Microbiology. 1978. V. 2. № 2. P. 252–255.
27. L. Okabe. On a method of the standardization of anti-diphtheria serum by the use of tissue cultivation // Kitasato Archive of experimental Medicine. 1933. V. 10. P. 41–56.
28. Е.В. Пименова, Н.П. Храпова. Изучение потенциальной токсичности антигенов *Burkholderia pseudomallei* на модели перевиваемых клеточных культур // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. № 7. С. 247–250.
29. E. Walum, B. Ekwall. Cell toxicology a new paradigm // ALTA. 2000. V. 28. Suppl. 1. P. 159.
30. Биотика: учебник для вузов / Под ред. В.П. Лопатина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 272 с.
31. ГОСТ Р ИСО 10993.5-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*. – М.: Госстандарт, 2011. 12 с.
32. М.Ю. Еропкина, Е.М. Еропкина. Культура клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. – СПб. 2003. 240 с.
33. О.И. Сальникова. Культура клеток в изучении и тестировании токсинов холерного вибриона: автореф. дис. ... к.б.н. – Саратов. 1994. 20 с.
34. Animal cell culture. Third edition. A practical approach / Ed. by J.W. Masters. – Oxford. 2000. 315 p.
35. C. Placido-Sousa, D.G. Evans. The action of diphtheria toxin on tissue cultures and its neutralization by antitoxin // The British Journal of Experimental Pathology. 1957. V. 38. P. 644–650.
36. О.В. Маркина, Е.В. Монахова, Л.П. Алексеева, Р.В. Писанов. Изучение биологического действия гемагглютинин / протеазы холерных вибрионов на модели культур клеток // Проблемы особо опасных инфекций. 2007. Вып. 94. С. 58–61.
37. D. Jin, U. Luo, M. Zheng, H. Li, J. Zhang, M. Stampfl, X. Xu, G. Ding, Y. Zhang, Y.-W. Tang. Quantitative detection of *Vibrio cholerae* toxin by real-time and dynamic cytotoxicity monitoring // Journal of Clinical Microbiology. 2013. V. 51. № 12. P. 3968–3974.
38. M. Pinto, S. Robine-Leon, M.D. Appay. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human carcinoma cell line CaCo-2 cells in culture // Biol. Cell. 1983. V. 47. P. 323–330.
39. Т.А. Храменкова, О.В. Громова, М.Н. Киреев, А.В. Наумов. Индикация цитотоксического действия некоторых факторов патогенности возбудителей чумы и холеры с помощью *Tetrahymena pyriformis* // Пробл. особо опасных инфекций. – Саратов. 2000. С. 109–113.
40. Патент РФ № 2281507. Способ оценки токсичности бактериальных антигенов / С.И. Жукова, Ф.К. Адельшин и др.; патентообладатель Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. – № 2004133598/15; заявл. 17.11.2004, опубл. 10.08.2006.
41. Н.В. Сенявина, Е.В. Трушкин, А.Л. Русанов, В.А. Петров, А.Ю. Шкурников, У. Маркс, Д.А. Сахаров. Современные технологии тестирования лекарств *in vitro*: использование микробиореакторов // Биотехнология. 2013. № 1. С. 51–58.
42. J.H. Tsui, W. Lee, S.H. Pun, J. Kim, D.-H. Kim. Microfluidics-assisted *in vitro* drug screening and carrier production // Adv Drug Deliv Rev. 2013. November.
43. Т.А. Гуськова, Р.Д. Сюбаев, И.Н. Немкова, Г.Н. Енгальчева. Изучение токсичности лекарственных средств *in vitro* при оценке их токсикологического взаимодействия // Биомедицина. 2010. № 5. С. 74–76.