

УДК 57.083.132

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ HAEMOPHILUS INFLUENZAE ТИП В – ПРОДУЦЕНТОВ ПОЛИРИБОЗИЛРИБИТОЛФОСФАТА – ОСНОВНОГО КОМПОНЕНТА ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИН

**Е.Л. Салимова, А.Д. Конон, С.В. Петровский,
В.П. Трухин, И.В. Красильников**

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по произ-
водству бактериальных препаратов»

Федерального медико-биологического агентства
198320, Санкт-Петербург, г. Красное Село, ул. Свободы, д. 52
E-mail: e.l.salimova@spbniiivs.ru

Одной из актуальных задач современной иммунобиотехнологии является разработка и внедрение эффективной вакцины против гемофильной инфекции, возбудителем которой является бактерия *Haemophilus influenzae* тип b (Hib). Основным действующим веществом вакцины против Hib-инфекции является капсульный полисахарид полирибозилрибитолфосфат (ПРФ), который выделяют из культуральной жидкости *H. influenzae* тип b. Важным технологическим этапом получения ПРФ является культивирование штамма-продуцента в условиях, позволяющих получить максимальное количество целевого продукта. На данный момент планируется подбор оптимальных условий культивирования штамма *H. influenzae* тип b B-7884, изолированного и идентифицированного ранее сотрудниками ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России. **Цель** данной работы – обобщить и проанализировать данные литературы относительно особенностей культивирования штаммов *H. influenzae* тип b, а также выделения основных факторов, влияющих на биосинтез ПРФ. **Материалы и методы.** В процессе подбора материала для написания обзорной статьи использовали базы данных Google Patents, Science Research Portal, Google Scholar, ScienceDirect, CiteSeer, Publications, ResearchIndex, Ingenta, PubMed, KEGG и др. **Результаты и обсуждение.** В результате анализа литературы были выделены основные факторы, влияющие на биосинтез ПРФ: природа и концентрация источников углерода и азота в составе питательной среды, концентрация факторов роста (никотинамидадениндинуклеотид, гемин, витамины), дополнительное внесение подпитки, регуляция pH в процессе культивирования, скорость перемешивания. Обобщены данные по штаммам-продуцентам ПРФ и условиям их культивирования, а также количеству синтезированного ПРФ, которое существенно зависит и от физиологических возможностей биологического агента, и от факторов, влияющих на регуляцию метаболизма. **Заключение.** Результаты данной работы будут учитываться при проведении исследований по оптимизации условий культивирования штамма *H. influenzae* тип b B-7884.

Ключевые слова: *Haemophilus influenzae* тип b, гемофильная инфекция, культивирование, питательные среды, полирибозилрибитолфосфат

Для цитирования:

Салимова Е.Л., Конон А.Д., Петровский С.В.,
Трухин В.П., Красильников И.В.
ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ
HAEMOPHILUS INFLUENZAE ТИП В – ПРОДУЦЕН-
ТОВ ПОЛИРИБОЗИЛРИБИТОЛФОСФАТА – ОСНОВНО-
ГО КОМПОНЕНТА ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИН.
Фармация и фармакология. 2017;5(5):422-441.
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-422-441

© Салимова Е.Л., Конон А.Д., Петровский С.В.,
Трухин В.П., Красильников И.В., 2017

For citation:

Salimova E.L., Konon A.D., Petrovskii S.V.,
Truhin V.P., Krasilnikov I.V.
PECULIARITIES OF CULTIVATION OF HAEMOPHI-
LUS INFLUENZAE TYPE b STRAINS – PRODUCERS
OF POLYRIBOSYL RIBITOL PHOSPHATE – THE MAIN
COMPONENT OF POLYSACCHARIDE VACCINES.
Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(5):422-441. (In Russ.)
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-422-441

PECULIARITIES OF CULTIVATION OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TYPE B STRAINS – PRODUCERS OF POLYRIBOSYL-RIBITOL PHOSPHATE – THE MAIN COMPONENT OF POLYSACCHARIDE VACCINES

E.L. Salimova, A.D. Konon, S.V. Petrovskii, V.P. Truhin, I.V. Krasilnikov

*The federal state unitary enterprise “Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency
52, Svoboda Str, Krasnoe selo, St.-Peterburg, Russia, 198320
E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru*

One of the up-to-date challenges of modern immunobiotechnology is the development and introduction of an effective vaccine against the infection caused by the bacterium *Haemophilus influenzae*, type b (Hib). The main active substance of the vaccine against Hib infection is the capsular polysaccharide polyribosylribitol phosphate (PRP), which is isolated from the fermentation broth of *H. influenzae* type b. An important technological step in obtaining PRP is the cultivation of the producer strain under conditions that allow obtaining the maximum amount of the target product. At the moment, it is planned to select the optimal conditions for cultivation of *H. influenzae* type b B-7884, which had been earlier isolated and identified by the employees of FSUE “Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of FMBA, Russia. The analysis of literature data concerning the cultivation of *H. influenzae* type b was made in order to identify the main factors influencing the biosynthesis of PRP. The aim of the investigation is to analyze and summarize the literature data on the cultivation peculiarities of *haemophilus influenzae* of b-type strains. **Materials and methods.** In the process of selecting the material for writing this review article. The databases of Google Patents, Science Research Portal, Google Scholar, ScienceDirect, CiteSeer Publications ResearchIndex, Ingenta, PubMed, KEGG, etc. were used. **Results and discussion.** As a result of the literature analysis, the main factors influencing the PRP biosynthesis were identified: the nature and concentration of carbon and nitrogen sources in the growth medium, the concentration of growth factors (nicotinamide adenine dinucleotide, hemin, vitamins), additional feed, pH adjustment during cultivation, stirring speed. The data of PRP-producing strains and the conditions of their cultivation have been summarized, as well as the amount of synthesized PRP, which essentially depends on both the physiological capabilities of the biological agent and the factors effecting the regulation of metabolism. **Conclusion.** The results of this work will be taken into account in carrying out the researches for optimization of *H. influenzae* type b B-7884 strain cultivation conditions.

Keywords: *Haemophilus influenzae* type b, hemophilic infection, cultivation, growth mediums, polyribosylribitol phosphate

Введение. Одной из основных причин заболеваемости и смертности детей младшего возраста от пневмонии и менингита является бактерия *Haemophilus influenzae* тип b (Hib) [1–5]. Считается, что единственный эффективный способ предотвращения инфекций, вызываемых Hib (гемофильной инфекции), – вакцинация [6–11].

В состав вакцины против гемофильной инфекции входит капсульный полисахарид полирибозилрибитолфосфат (ПРФ), синтезируемый *H. influenzae* тип b в значительных количествах при росте на жидких питательных средах [12]. Известно, что одним из наиболее важных этапов при производстве вакцин является культивирование продуцента в оптимальных условиях, что позволяет получить максимальный выход целевого продукта с минимальными затратами.

Ранее сотрудниками ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России был изолирован штамм идентифицированный как *H. influenzae* тип b. Проведено депонирование данного штамма в Государственной коллекции патогенных микроорга-

низмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск» Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) под номером B-7884 для целей национальной патентной процедуры [13], в результате которой был получен патент на изобретение [14]. Подобраны условия получения и отработаны методики контроля Главной и Рабочей посевной культуры. На следующем этапе планируется подбор оптимального компонентного состава жидкой питательной среды, а также условий культивирования штамма B-7884 для получения максимального количества капсульного полисахарида полирибозилрибитолфосфата (ПРФ).

Цель данной работы – обобщить и проанализировать данные литературы относительно особенностей культивирования штаммов *H. influenzae* тип b.

Материалы и методы. В процессе подбора материала для написания обзорной статьи использовали базы данных Google Patents, Science Research Portal, Google Scholar, ScienceDirect, CiteSeer, Publications, ResearchIndex, Ingenta, PubMed, KEGG и др. Поиск статей проводили по ключевым словам «*Haemophilus*

influenzae type b», «PRP», «cultivation», «culture medium», «fermenter».

Результаты и обсуждение. Подбор оптимальных условий культивирования, в первую очередь, связан с физиологическими особенностями продуцента и закономерностями синтеза целевого продукта. Учитывая, что полирибозилрибитолфосфат является капсульным полисахаридом *H. influenzae* тип b, вопросы, связанные с его биосинтезом в зависимости от фазы роста продуцента, выделением в питательную среду, влиянием предшественников биосинтеза, зависимостью образования полисахарида от скорости накопления биомассы особо интересны [15].

Так, еще в 70-х годах прошлого века было установлено, что синтез ПРФ у шести исследуемых штаммов *H. influenzae* тип b происходит одновременно с ростом культуры и максимальный уровень накопления целевого продукта наблюдается в ранней стационарной фазе роста [16].

Капсульный полисахарид синтезируется экзогенно, его освобождение в культуральную жидкость происходит через несколько часов после окончания биосинтеза. При этом скорость освобождения полисахарида в экспоненциальной фазе роста индивидуальна для каждого штамма. Выделение ПРФ в питательную среду происходило самопроизвольно, однако авторы [16] подчеркивают, что для ускорения данного процесса и увеличения количества синтезированного полисахарида целесообразным является нагревание или обработка биомассы ультразвуком.

Другой интересный подход по увеличению количества отделяемого полисахарида описан в патенте [17]. Авторы предложили по завершению ферментации снижать температуру до комнатной и выдерживать в таких условиях культуральную жидкость. Показано, что количество синтезированного ПРФ через 12 ч культивирования составляло 330 мкг/мл, а выдерживание при комнатной температуре несколько часов после 16 ч культивирования позволяло увеличить уровень антигена до 480 мкг/мл. Исследователи обращают внимание на необходимость начала охлаждения в определенное время: раньше – возможны потери по полисахариду, позже – может происходить лизис клеток и дополнительная контаминация [17].

Исследователи также отмечают, что интенсификация биосинтеза целевого продукта возможна как непосредственно за счет увеличения уровня биомассы (например, при внесении источников углеводов или увеличения аэрации), так и при увеличении биосинтетической способности штамма. Например, буферизация питательной среды приводила к удлинению стационарного роста продуцента с последующим увеличением количества синтезированного ПРФ [16].

Ученые также изучали влияние предшественников биосинтеза на образование капсульного полисахарида при росте *H. influenzae* тип b на среде, содержащей гидролизат казеина и дрожжевой экстракт. Показано, что максимальный уровень ПРФ (63–65 мкг

пентозы ПРФ/мл) наблюдали при добавлении 0,1% рибозы или 0,5% глюкозы, тогда как без предшественников он был в 6,3–6,5 раза ниже. Интересно, что добавление рибитола не влияло на биосинтез целевого продукта. Авторы объясняют данное явление проблемами транспорта и активации данного C_5 -спирта в клетке [16].

В 60-70-х годах XX столетия учеными стали активно предлагаться синтетические среды для культивирования штаммов *H. influenzae*. Первые синтетические и полусинтетические питательные среды, используемые для выделения и поддержания роста *H. influenzae*, имели очень сложный, многокомпонентный состав, включая множество аминокислот, витаминов, факторы роста, неорганические соли. Например, среда Herriott [18] содержала 30 компонентов. В другой работе [19] предложена синтетическая питательная среда, состоящая из 29 компонентов.

В то же время проводились эксперименты по упрощению ее состава. Так, Klein R.D. с соавт. было предложено две модификации среды Herriott и количество компонентов уже снижено до 13–14 позиций [20].

Учитывая метаболические особенности *H. influenzae* тип b, еще в 80-х годах прошлого столетия исследователи стали уделять значительное внимание влиянию гемина (фактор X) и никотинамидадениндинуклеотида (НАД, фактор V) на рост культуры, а в дальнейшем и на биосинтез ПРФ [21].

Относительно исследований, проводимых на сегодняшний день, среди них можно выделить несколько направлений: поиск наиболее продуктивных штаммов, подбор оптимальных условий культивирования, а также изучение биосинтеза ПРФ на альтернативных средах без компонентов животного происхождения.

В статье [22] описано изучение биосинтеза ПРФ пятью штаммами *H. influenzae* тип b, изолированными от больных детей и условно названными H. inf. 1, H. inf. 2, H. inf. 3, ATF1 (ATCC 35540) и ATF2 (ATCC 10210). Показано, что максимальный синтез ПРФ (192 мкг/мл) и концентрация клеток ($3,3 \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл) среди изученных штаммов были характерны для штамма ATF2 при росте на GC бульоне с факторами роста.

Похожие исследования были проведены для других семи штаммов [23]. Изучали штаммы, выделенные от больных детей (Hib(1), Hib(2), Hib(3), Hib(4b), Hib(7b)), а также штаммы из американской коллекции ATCC 35540 (Hib(5s)) и ATCC 10210 (Hib(6s)). Интересно, что в данном случае максимальная концентрация клеток наблюдалась для четырех штаммов на среде сердечно-мозгового бульона (ВН) с добавками факторов роста и составляла 10^{13} КОЕ/мл. При этом наибольшая концентрация синтезированного полисахарида была характерна для штамма ATCC 35540 (Hib(5s)) и составляла 321 мкг/мл [23].

Различные способы культивирования также могут влиять на выход капсульного полисахарида. Так, бразильские ученые [24] исследовали особенности роста и синтеза ПРФ штаммом GB 3291 при пери-

одической ферментации в течение 24 ч (вариант 1), при ферментации с подпиткой глюкозой (5 г/л) на 9 ч (вариант 2) и при ферментации с заменой питательной среды через 12 ч культивирования (вариант 3). Показано, что при использовании варианта 1 концентрация ПРФ составляла 140 мкг/мл, а накопление целевого продукта было сопряжено с ростом культуры. Культивирование с подпиткой не позволило увеличить концентрацию целевого продукта в связи с тем, что дополнительно внесенная глюкоза практически не потреблялась культурой. Использование третьего способа культивирования позволило увеличить продуктивность до 87 мг ПРФ/г биомассы при второй ферментации после замены питательной среды, тогда как при первом варианте культивирования она составляла 67 мг ПРФ/г биомассы. Отметим, что сама концентрация полисахарида практически не отличалась в зависимости от выбранного способа ферментации (относительная вариация 0–17%) и была на уровне 132–155 мкг/мл. Используя подходы к математическому описанию процесса ферментации, предложенные Коно-Асай и Луедекен-Пирет, авторы подтвердили свое предположение, что накопление целевого продукта напрямую связано с накоплением биомассы [24].

Интересными являются дальнейшие исследования данных ученых, которые установили следующие закономерности синтеза ПРФ штаммом *H. influenzae* тип b GB 3291 и смогли в значительной степени увеличить его продуктивность [25]. На биосинтез полисахарида оказывает значительное влияние регуляция pH: поддержание pH на нейтральном уровне ($7,2 \pm 0,2$) позволяет увеличить выход ПРФ. Так, с регуляцией pH и выходом на стационарную фазу роста синтез антигена продолжался и увеличивался, в отличие от варианта без регуляции pH, где увеличение количества антигена наблюдали только в экспоненциальной фазе роста. Подпитку в виде глюкозы (при регуляции pH) клетки быстро катаболизировали с одновременным синтезом биомассы и антигена. При выходе культуры на стационарную фазу роста потребление глюкозы замедлялось, но синтез полисахарида активно продолжался. При этом после достижения стационарной фазы роста (10 ч) подпитка напрямую конвертировалась в полисахарид (при условии регуляции pH). Кроме того, было показано, что при насыщении кислородом 30% с контролем pH количество синтезированного полисахарида составляло 943,3 мкг/мл, что было на 124 % выше по сравнению с традиционным синтезом при неизменной аэрации (420,8 мкг/мл). Поддержание парциального давления и pH на определенном уровне приводило к удлинению экспоненциальной и стационарной фаз роста и соответственно к увеличению образования ПРФ. Авторы предполагают, что регуляция pH и поддержание аэрации на определенном уровне также положительно влияет на экспрессию генов, отвечающих за синтез капсульного полисахарида [25].

Современные мировые тенденции требуют от

биотехнологов разработки новых подходов к подбору питательной среды для культивирования продуцентов, особенно тех, которые для своей жизнедеятельности требуют компоненты животного происхождения. К таким микроорганизмам относятся *H. influenzae* тип b, для культивирования которого часто используют среды с животными компонентами, например, сердечно-мозговой бульон, шоколадный агар с кровью, пептоны животного происхождения. Кроме того, фактором роста *H. influenzae* тип b является гем [26, 27], который в виде, например, раствора гема хлорида, обязательно вносят в питательную среду. Поэтому все чаще ученые уделяют внимание подбору альтернативных питательных сред на основе растительных компонентов, например, пептонов. Так, большинство современных патентов, касающихся биосинтеза ПРФ *H. influenzae* тип b, посвящены подбору оптимального состава именно таких питательных сред.

В патенте [28] приводится информация по компонентному составу питательной среды, содержащей неорганические соли, глюкозу, дрожжевой экстракт, некоторые аминокислоты, гемин и НАД, а также пептон растительного происхождения. Установлено, что при выращивании штамма *H. influenzae* тип b CS 68 на данной питательной среде количество полисахарида, собранного с 700 л культуральной жидкости, составляло 70–80 г.

В работе [29] описана модифицированная соево-пептоновая среда с дрожжевым экстрактом и оптимизированной концентрацией гема (30 мг/л) и НАД (15 мг/л), использование которой в условиях принудительной аэрации и контроля pH приводило к увеличению синтеза ПРФ до 980 мкг/мл.

Помимо подбора оптимального состава питательной среды ученые особое внимание уделяют селекции и получению высокоактивных продуцентов ПРФ. Так, в патенте [30] авторы описали гетерогенную популяцию *H. influenzae* серотипа b, которая содержит инкапсулированные и неинкапсулированные бактерии. Показано, что после 18–24 ч культивирования на селективных твердых питательных средах различали белые и серые колонии, которые значительно отличались по продуктивности. Так, белые колонии синтезировали в 3–5 раз больше ПРФ по сравнению с колониями серого цвета и их продуктивность сохранялась на протяжении 4-х генераций. Для селективного выделения высокопродуктивных белых колоний была предложена синтетическая твердая питательная среда, содержащая растительный пептон, дрожжевой экстракт, неорганические соли, углеводы, факторы роста. Ученые предположили, что клетки, образующие белые колонии, содержат как минимум два локуса, отвечающих за синтез целевого антигена [30].

Штамм с подобными генетическими характеристиками использовали авторы другого патента [31]. Они исследовали инкапсулированный штамм *H. influenzae* тип b, содержащий как минимум две копии локуса (размер между 17 и 18 кДа) в генетическом

коде, которые группируют вместе гены, отвечающие за синтез и экспрессию полисахаридной капсулы. Использование предложенной в патенте химической среды позволило получить стабильный штамм в 20 генерациях. Ученые провели значительную работу по изучению влияния компонентного состава питательной среды на биосинтез ПРФ, а также по подбору компонентов неживотного происхождения для ее состава [31]. При подборе питательной среды исследователи исключали из ее состава белки, что, по их мнению, значительно облегчает очистку целевого продукта и исключает использование пеногасителя. Установлено, что для культивирования исследуемого штамма в питательной среде должен присутствовать ряд аминокислот, при этом показана возможность регуляции биосинтеза полисахарида концентрацией аспарагиновой кислоты, аспарагина и глутамина [31]. Концентрация данных аминокислот была выбрана таким образом, чтобы направить метаболизм клетки на производство капсульного полисахарида. Кроме того, в патенте [31] описано положительное влияние на продукцию целевого продукта ряда витаминов в составе питательной среды.

При замене животных компонентов питательной среды на альтернативные встает вопрос источника гема для *H. influenzae* тип b, для которого данный порфирин является незаменимым фактором роста. В патенте [31] предложено заменить гемин животного происхождения на динатриевую соль протопорфирина или синтетический протопорфирин IX в концентрациях 0,25 и 2,0 мг/л.

Интересный подход к увеличению синтеза биомассы или целевого продукта можно использовать, применяя смеси субстратов для культивирования [32, 33]. Показано, что штамм, описанный в патенте [31], способен расщеплять глюкозу, фруктозу, галактозу, глицерин, ксилозу, рибозу, фукозу, сиаловую кислоту и лактат, а также для его культивирования можно использовать два и более источника углерода, как например, глюкозу (12–16 г/л) и лактат (0,5–10 г/л). По нашему мнению, изучение данного вопроса и работа в данном направлении может быть перспективной.

Кроме того, важным показателем, влияющим на биосинтез целевого продукта, является соотношение углерод/азот в питательной среде [34, 35]. Так, в патенте [31] подчеркивается, что соотношение пептона и дрожжевого экстракта должно быть более или равно 1, а содержание общего азота – более 0,8 г/л.

В работе авторы [36] изучали влияние концентрации декстрозы и дрожжевого экстракта на синтез ПРФ *H. influenzae* тип b ATCC No. 10211. Проводили модификацию двух питательных сред: среды, содержащей в качестве основных компонентов соевый пептон и дрожжевой экстракт (МР), а также среды, в состав которой входил казитон и дрожжевой экстракт (СУ) [37]. Модификация заключалась в изменении концентрации декстрозы и дрожжевого экстракта в пределах 0–10 и 0–7,5 г/л соответственно. Эксперименты по подбору оптимальной концентрации

источника углерода и азота проводили в колбах Эрленмейера, содержащих по 1,0 л питательной среды соответствующего варианта, на шейкер-инкубаторе при 200 об/мин, температуре 37°C на протяжении 15 ч. Установлено, что максимальный синтез ПРФ (453–511 мг/л) наблюдали при концентрации декстрозы и дрожжевого экстракта 2,5 и 6 г/л соответственно при культивировании на среде МР. При культивировании штамма в модифицированной среде МР с подобранной оптимальной концентрацией дрожжевого экстракта и глюкозы в ферментере объемом 50 л выход полисахарида составил 524 мг/л.

Таким образом, при подборе оптимального состава питательной среды для культивирования продуцента обязательно необходимо учитывать соотношение C/N.

Опубликовано несколько работ, посвященных оптимизации условий культивирования *H. influenzae* тип b при помощи математических методов планирования [38]. Так, индийские ученые подбирали оптимальный состав питательной среды для получения ПРФ с применением плана Плакетт-Бурмана [39]. Установлено, что максимальный синтез капсульного полисахарида (183 мкг/мл) исследуемым штаммом наблюдали на подобранной среде следующего состава (г/л): глутаматная кислота – 2, дрожжевой экстракт – 15, цистеин – 0,008, декстроза – 7,5, НАД – 0,008, гемин – 0,02, NaCl – 4, NH₄Cl – 0,85, Na₂HPO₄ – 4,5, KCl – 0,11, MgSO₄ 7H₂O – 0,6.

Другие авторы использовали центральный композиционный план и методологию поверхности отклика для подбора оптимальных значений внешних факторов (температура, pH, скорость перемешивания), влияющих на количество образующейся биомассы *H. influenzae* тип b ATCC 10211 [40]. Установлено, что при температуре 35°C, перемешивании 250 об/мин и pH 8,5 уровень сухой биомассы составлял 5471 мг/л.

Результаты по усовершенствованию технологии получения ПРФ, а также ее масштабированию представлены в работах [41, 42]. Авторы в пилотных масштабах (2 л питательной среды) модифицировали среду на основе казаминовых кислот и дрожжевого экстракта, изменяя концентрацию глюкозы, дрожжевого экстракта, гема и НАД в ее составе. Культивирование на среде с оптимально подобранным составом компонентов позволило увеличить выход ПРФ до 1050 мкг/мл, тогда как при масштабировании до 50 л и поддержании pH на уровне 7,5 и парциального давления кислорода – 30 % полученная концентрация полисахарида составила 1160 мкг/мл.

Российскими учеными предложено несколько вариантов питательных сред для культивирования *H. influenzae* тип b. Так, в патенте, принадлежащем Ростовскому научно-исследовательскому институту микробиологии и паразитологии [43], описана достаточно простая питательная среда на основе казаминовых кислот. Другие авторы за основу брали среду Klein с добавлением НАД и гема (синтетическая

среда) и дополнительным внесением казеинового пептона и глюкозы (полусинтетическая среда) [44]. Установлено, что продуктивность штамма 326 на синтетической среде составляла 90–150 мкг/мл, тогда как на полусинтетической – 80–130 мкг/мл. Синтетическую и полусинтетическую питательную среду (на основе аминокислот) для культивирования штамма 267 (Mech №1) использовали и авторы патента [45], принадлежащего Научно-исследовательскому институту вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. В другом патенте [46] описан состав питательной среды для культивирования *H. influenzae* тип b, преимуществом которой является ее низкая стоимость. В состав питательной среды входит 11 компонентов (в г/л: NaCl – 5,8; MgCl₂ – 0,2; CaCl₂ – 0,022; K₂HPO₄ – 2,720; K₂HPO₄ – 3,480; глюкоза – 5,000; гемин – 0,01; НАД – 0,004; пантотенат кальция – 0,004; тиамин – 0,004 мл; аминокислота – 300 мл), а ее приготовление включает 8 этапов. Подробно особенности культивирования *H. influenzae* тип b на полусинтетических и синтетических средах описаны в статьях данного авторского коллектива [47, 48], а закономерности синтеза полисахарида и биомассы на этих средах в зависимости от концентрации факторов роста – в работе [49]. Установлено, что увеличение концентрации гемина и НАД приводило к увеличению количества биомассы, однако количество синтезированного ПРФ снижалось.

В таблице 1 обобщены данные по условиям культивирования различных штаммов *H. influenzae* тип b

и представлены количественные показатели по биосинтезу ПРФ.

Как видно из данных, приведенных в таблице 1, для биосинтеза ПРФ штаммами *H. influenzae* тип b используются различные по составу, в основном полусинтетические питательные среды. В результате оптимизации их состава и масштабирования технологического этапа культивирования на ферментационное оборудование показатели синтеза ПРФ для некоторых штаммов были увеличены до 1000 мкг/мл. Отметим, что в отечественных доступных нам источниках литературы максимальные показатели синтеза ПРФ составляют 130–150 мкг/мл.

Закключение. Анализ литературных данных показал, что подбор оптимального состава питательной среды (концентрация углерода, азота (их соотношение), факторов роста) и самих условий культивирования (необходимость внесения подпитки, pH) позволяет достичь максимального биосинтеза капсульного полисахарида полирибозилрибитолфосфата *H. influenzae* тип b и сократить время культивирования как технологического этапа производства ПРФ. Кроме того, обязательно необходимо учитывать экономическую составляющую технологического процесса. Результаты данной работы будут учитываться при проведении экспериментальных работ по подбору питательной среды и условий культивирования штамма *H. influenzae* тип b B-7884 как при разработке технологии в лабораторных условиях, так и при ее масштабировании при опытно-промышленном производстве.

Таблица 1 – Синтез ПРФ в зависимости от условий культивирования штаммов *H. influenzae* тип b

Штамм	Питательная среда	Способ культивирования	Продуктивность, мкг/мл	Ссылка
Mad	Сердечно-мозговой бульон и триптиказо-соевая основная среда	Не указано	72,6	[16]
GB 3291	Соевый пептон – 10,0 г, диализат дрожжевого экстракта – 5,0 г, K ₂ HPO ₄ – 2,5 г, Na ₂ HPO ₄ – 13,1 г, NaH ₂ PO ₄ – 3,3 г, глюкоза – 5,0 г, гемин хлорид – 10,0 мг, НАД – 10,0 мг, дистиллированная вода – до 1 л. Поддержание pH на уровне 7,5 при помощи 5,0 н NaOH	В ферментере объемом 13 л, рабочий объем питательной среды – 7,4 л, скорость перемешивания – 100–600 об/мин, 37°C, скорость подачи воздуха – 2 л/мин. Регуляция pH не проводилась	155,0	[24]
GB 3291	Соевый пептон – 10,0 г, диализат дрожжевого экстракта – 5,0 г, K ₂ HPO ₄ – 2,5 г, Na ₂ HPO ₄ – 13,1 г, NaH ₂ PO ₄ – 3,3 г, глюкоза – 5,0 г, гемин хлорид – 30,0 мг, НАД – 15,0 мг, дистиллированная вода – до 1 л. Поддержание pH на уровне 7,2 при помощи 5,0 М NaOH	В ферментере объемом 13 л, рабочий объем питательной среды – 7,4 л, скорость перемешивания – 100–600 об/мин, 37°C, скорость подачи воздуха – 0,25 объема воздуха/объем питательной среды в мин, насыщенность воздухом на уровне 30%, поддержание pH на уровне 7,2	943,3	[25]
ATCC 35540 (Hib(5s))	Сердечно-мозговой бульон с добавками 1% раствора гемоглобина и 1% раствора Isovitalex (содержит НАД, витамины и микроэлементы)	В колбах на качалке в течение 24 ч при 37°C в присутствии 5–10% CO ₂	321,0	[23]

Продолжение таблицы 1

Штамм	Питательная среда	Способ культивирования	Продуктивность, мкг/мл	Ссылка
ATF2 (ATCC 10210)	Панкреатический гидролизат казеина – 7,5 г, пептический перевар животной ткани – 7,5 г, кукурузный крахмал – 1,0 г, K_2HPO_4 – 4,0 г, KH_2PO_4 – 1,0 г, NaCl – 5,0 г, глюкоза – 5,0 г, вода – до 1 л, дополнительно добавлены гемин – 10 мг/мл и IsovitaleX, содержащий 0,01/мл НАД	В колбах на качалке в течение 24 ч при 37°C в присутствии 5–10 % CO_2 , pH 7,5	192,0	[22]
Mad	Казаминовые кислоты – 1 %, диализат дрожжевого экстракта – 0,5 %, NaCl и натрий-фосфатный буфер согласно прописи. Добавки в виде подготовленной лошадиной крови в количестве 1/1000 и III НАД в количестве 1 мкг/мл	Не указано	133,0 (по пентозе ПРФ)	[16]
Не указано	Глутаминовая кислота – 2,0 г, дрожжевой экстракт – 15,0 г, цистеин – 0,008 г, декстроза – 7,5 г, НАД – 0,008 г, гемин – 0,02 г, NaCl – 4,0 г, NH_4Cl – 0,85 г, Na_2HPO_4 – 4,5 г, KCl – 0,11 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,6 г, вода – до 1 л	Ферментер объемом 6 л	180,0–183,0	[39]
A760705	L-глутаминовая кислота – 1,3 г, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ – 2,5 г, KCl – 0,09 г, NaCl – 6,0 г, NH_4Cl – 1,25 г, дрожжевой экстракт – 10 г, цистеин – 0,015 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,6 г, декстроза – 5,0 г, гемин – 0,005 г, НАД – 0,002 г, вода – до 1 л	Ферментер рабочим объемом 40 л, скорость аэрации – 5 л/мин, насыщенность воздухом на уровне 30%, скорость перемешивания – 300–700 об/мин, pH 7,0	480,0	[17]
Гетерогенная популяция (отбирали продуктивные белые колонии)	3-НАД – 5,0 мг, протопорфирин IX – 1,0 мг, глюкоза – 20,0 г, дрожжевой экстракт – 5,0 г, гороховый пептон – 7,42 г, лактат натрия в 60% водном растворе – 1,49 мл, цистин – 0,07 г, триптофан – 0,02 г, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 31,14 г, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ – 2,03 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,4 г, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,02 г, $(NH_4)_2SO_4$ – 1 г, вода – до 1 л	Ферментер объемом 1 л, при (37±1) °C, перемешивание, давление 0,1 бар, pO_2 – 30%, скорость подачи воздуха – 0,25 объема воздуха/объем питательной среды в мин	719,0–904,0	[30]
ATCC10211	Казаминовые кислоты – 10,0 г/л, диализат дрожжевого экстракта – 2,5 г/л, глюкоза – 6,0 г/л, 0,1 М натрий фосфатный буфер, pH 7,6. Дополнительно на 1 л питательной среды вносили 0,015 г НАД и 0,03 г гемина	В колбах (объем культуральной жидкости – 2 л), при 36,5 °C, 250 об/мин, с подпиткой раствором глюкозы и дрожжевого экстракта	1050,0	[42]
		В ферментере объемом 50 л, при температуре 36,5°C; скорость подачи воздуха – 0,6–0,8 объема воздуха/объем питательной среды в мин, перемешивание – 400–900 об/мин, pH – 7,3, насыщенность воздухом на уровне 30 %, с подпиткой раствором глюкозы и дрожжевого экстракта	1160,0	
	Среда, содержащая Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 , НАД, гемин, соевый пептон, дрожжевой экстракт – 2,5 г/л, декстроза – 6 г/л	В колбах (объем культуральной жидкости – 1 л), при 37°C, 200 об/мин	453,0–511,0	[36]
		В ферментере объемом 50 л	524,0	

Штамм	Питательная среда	Способ культивирования	Продуктивность, мкг/мл	Ссылка
Капсулированный штамм, содержащий как минимум 2 копии локуса в генетическом коде	60 % лактат натрия – 1,5 мл/л, K_2HPO_4 – 300 мг/л, KH_2PO_4 – 300 мг/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 368 мг/л, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 28620 мг/л, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ – 1870 мг/л, L-аргинин – 87 мг/л, L-аланин – 134 мг/л, L-аспарагин – 198 мг/л, L-лизин – 140 мг/л, L-глутамин – 220 мг/л, L-гистидин – 78 мг/л, L-триптофан – 200 мг/л, L-валин – 115 мг/л, L-изолейцин – 130 мг/л, L-лейцин – 130 мг/л, L-тирозин – 180 мг/л, L-фенилаланин – 165 мг/л, L-цистин – 61 мг/л, L-аспарагиновая кислота – 1065 мг/л, L-глутаминовая кислота – 1471 мг/л, пиридоксин HCl – 4 мг/л, рибофлавин – 0,2 мг/л, тиамин HCl – 4 мг/л, биотин – 4 мг/л, кальций пантотенат – 4,5 мг/л, урацил – 70 мг/л, гипоксантин – 20 мг/л, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2,5 мг/л, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 20 мг/л, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 1, $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 5 мг/л, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 13 мг/л, конечное pH – 7,2±0,1 (доведение 10 н раствором КОН) Дополнительно вносили: глюкоза – 512,8 г/л, раствор НАД, протопорфирин – 0,25 г/л, аммоний гидроксид – 5 мл/л	В ферментере 1000 л, при температуре (32±1)°C, pH (6,7±0,2) (доведение 2,5 н раствором натрия гидроксида), pO_2 поддерживали на уровне 70% путем каскадного изменения скорости перемешивания (от 100 до 230 об/мин), увеличением аэрации (от 70 до 150 л/мин), скорости потока O_2 от 0 до 500 л/мин. По мере необходимости вносили пеногаситель (4% раствор Biospumex)	865,0	[31]
CS 68	L-глутаминовая кислота – 1,5 г/л, сульфат аммония – 1,25 г/л, натрий фосфат двузамещенный двуводный ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) – 11,0 г/л, натрий фосфат однозамещенный двуводный ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) – 3,3 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, калий хлорид (KCl) – 100,0 мг/л, натрий хлорид (NaCl) – 6 г/л, экстракт растительного пептона – 10 г/л, НАД – 3,0 мг/л, гемин синтетический – 5,0 мг/л, глюкоза – 5,0 г/л, L-цистеин – 100 мг/л	При температуре 37°C, pH поддерживали на уровне 7,0	100,0–115,0	[28]
Eagan	Дрожжевой экстракт – 5 г/л, казеиновые кислоты – 22,5 г/л, двухосновный фосфат натрия – 14,4 г/л, декстроза – 5,59 г/л, гемин – 20 г, аммония гидроксид (30%) – 0,1534 мл, 1 % НАД – 0,6 мл	В ферментере 40 л, 16–18 ч	Данные не приведены	[50]
B 423	Бульон казеиновых кислот – 10,0 г/л, глюкоза – 5,0 г/л, диализат дрожжевого экстракта – 2,0 г/л, гемин – 0,001 г/л, НАД – 0,008 г/л, витамин B_{12} – 0,0005 г/л, pH 7,2–7,4	В атмосфере, насыщенной CO_2 , в течение 8–10 ч	Данные не приведены	[43]
326	Среда Klein с факторами роста (гемин, НАД) Среда Klein с факторами роста (гемин, НАД), казеиновый пептон – 20 г/л, глюкоза – 2 г/л	Ферментер марки «Анкум» в условиях принудительной аэрации при 37°C при постоянном перемешивании	90,0–150,0 80,0–130,0	[44]
267 (Mech №1)	Полусинтетическая (на основе аминокислоты) и синтетическая питательная среда	При 37°C на шуттеле при 200 об/мин. После достижения культурой стационарной фазы роста инкубацию продолжали в течение 6 часов	50,0–100,0	[45]

Introduction. One of the main causes of morbidity and mortality of young children from pneumonia and meningitis is bacteria *Haemophilus influenzae* type b (Hib) [1–5]. It is believed that the only one effective way to prevent the infections caused by Hib is vaccination [6–11].

The composition of the vaccine against the infection caused by *H. influenzae* type b includes capsular polysaccharide polyribosylribitol phosphate (PRP), synthesized by *H. influenzae* type b in significant quantities during the growth on liquid growth mediums [12]. It is known that one of the most important steps in the production of vaccines is cultivation of the producer under optimal conditions, which allows obtaining the maximum yield of the target product with minimal costs.

Previously the employees of the FSUE “Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of FMBA, Russia had isolated a strain identified as *H. influenzae* type b. This strain had been deposited under the registration number B-7884 in the National collection of pathogenic microorganisms and cell cultures «GKMP-Obolensk» for the purposes of the national patent proceeding [13] as a result of which a patent for the invention was obtained [14]. The conditions for obtaining of Master and Working cell bank had been selected as well as the methods for controlling had been worked out. At the next step, it is planned to select the optimal component composition of the liquid growth medium, as well as the conditions for cultivation of B-7884 strain to obtain the maximum amount of the capsular polysaccharide polyribosylribitol phosphate (PRP).

The **aim** of the investigation is to analyze and summarize the literature data on the cultivation peculiarities of *haemophilus influenzae* of b-type strains.

Materials and methods. In the process of selecting the material for writing a review article, we used the databases Google Patents, Science Research Portal, Google Scholar, ScienceDirect, CiteSeer, Publications, ResearchIndex, Ingenta, PubMed, KEGG, etc. The search of articles was conducted by the following keywords: «*Haemophilus influenzae* type b», «PRP», «cultivation», «culture medium», «fermenter».

Results and discussion. The selection of optimal conditions for cultivation is primarily associated with the physiological characteristics of the producer and the ways of synthesis of the target product.

Considering the fact that polyribosylribitol phosphate is a capsular polysaccharide of *H. influenzae* type b, the issues associated with its biosynthesis depending on the growth phase of the producer, release into the growth medium, the influence of biosynthetic precursors, the dependence of the formation of the polysaccharide on the rate of biomass accumulation are especially interesting [15].

Thus, back in the 70s of the previous century it was found out that the synthesis of PRP in six of the investigated *H. influenzae* type b strains occurred simultaneously with the growth of culture and the maximum level of

accumulation of the target product was observed in the early stationary growth phase [16].

Capsular polysaccharide is synthesized exogenously, its release into the fermentation broth occurs a few hours after the end of biosynthesis. The rate of release of the polysaccharide in the exponential growth phase is individual for each strain. The release of PRP into the fermentation broth occurred spontaneously, but the authors of the work [16] emphasize that it is advisable to heat or treat the biomass by ultrasound for speeding up the release of the polysaccharide and increase the amount of synthesized PRP.

Another interesting approach to increasing the amount of a detachable polysaccharide is described in the patent [17]. The authors proposed to lower the temperature to room temperature after the fermentation and hold the fermentation broth in such conditions. It was shown that the amount of synthesized PRP was 330 µg/ml after 12 h of cultivation, and keeping at room temperature for several hours after 16 h of cultivation allowed to increase the antigen level to 480 µg/ml. The researchers focus their attention on the necessity to start cooling at a certain time: earlier – losses on polysaccharide are possible, and later on cell lysis and additional contamination may occur [17].

The researchers also note that the intensification of the target product biosynthesis is possible either directly by increasing the level of biomass (for example, by introducing sources of carbohydrates or increasing the aeration) or by increasing the biosynthetic capacity of the strain. For example, buffering of the growth medium led to increasing elongation of the producer stationary phase with a subsequent increase in the amount of synthesized PRP [16].

The scientists also studied the effect of precursors of biosynthesis on capsular polysaccharide formation during *H. influenzae* type b growth on the medium containing casein digest and yeast extract. It was shown that the maximum level of PRP (63–65 µg pentose PRP/ml) was observed with the addition of 0.1% ribose or 0.5% glucose, whereas without precursors it was 6.3–6.5 times lower. It is interesting, but adding ribitol did not influence the target product biosynthesis. The authors explain this phenomenon by the problems of transport and activation of this C₅-alcohol in the cell [16].

In the 60–70s of the 20th century, the scientists began to actively propose synthetic medium for the cultivation of *H. influenzae* strains. The first synthetic and semi-synthetic growth mediums, used for isolation and keeping the growth of *H. influenzae*, had a very complex, multicomponent composition, including many amino acids, vitamins, growth factors, inorganic salts. For example, the Herriott medium [18] contained 30 components. In another work [19], a synthetic growth medium consisting of 29 components was proposed.

At the same time, experiments were carried out to simplify its composition. Thus, R.D. Klein with co-authors proposed two modifications of the Herriott medium and the number of the components was reduced up to 13–14 positions [20].

In the 80s of the previous century, taking into account the metabolic characteristics of *H. influenzae* type b, the researchers began to pay considerable attention to the influence of hemin (factor X) and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD, factor V) on the growth of culture, and further on the biosynthesis of PRP [21].

Concerning the studies conducted today, several areas can be identified among them: searching for the most productive strains, selecting optimal conditions for cultivation, and studying the PRP biosynthesis in alternative medium without components of animal origin.

In one of the articles [22] the study of PRP biosynthesis by five strains of *H. influenzae* type b, isolated from diseased children and conditionally named H. inf. 1, H. inf. 2, H. inf. 3, ATF1 (ATCC 35540) and ATF2 (ATCC 10210) is described. It was shown that the maximum PRP synthesis (192 µg/ml) and the cell concentration (3.3×10^{11} CFU/ml) among the studied strains were characteristic for ATF2 strain during the growth on GC broth with the growth factors.

Similar studies were conducted for the other seven strains [23]. The strains isolated from sick children (Hib (1), Hib (2), Hib (3), Hib (4b), Hib (7b)) and the strains from the American collection ATCC 35540 (Hib (5s)) and ATCC 10210 (Hib (6s)) were studied.

It is interesting that in this case the maximum cell concentration (10^{13} CFU/ml) was observed for four strains on brain-heart infusion medium (BHI) supplemented with growth factors. The highest concentration of the synthesized polysaccharide (321 µg/ml) was characteristic for the strain ATCC 35540 (Hib (5s)) [23].

Different cultivation ways can also influence the yield of the capsular polysaccharide. Thus, Brazilian scientists [24] studied the features of growth and synthesis of PRP by strain GB 3291 during periodic fermentation for 24 h (option 1), during fermentation with feed of glucose (5 g/l) for 9 h (option 2) and during fermentation with replacing the growth medium after 12 hours of cultivation (option 3). It was shown that while using option 1, the concentration of PRP was 140 µg/ml and the accumulation of the target product was associated with the growth of the culture. Cultivation with the feed did not allow increasing the concentration of the target product due to the fact that additionally introduced glucose was practically not consumed by the culture. Using the third cultivation option allowed increasing the productivity to 87 mg of PRP/g of biomass in the second fermentation after replacement of the growth medium, whereas in the first option of cultivation it was 67 mg of PRP/g of biomass. It should be noted that the concentration of the polysaccharide itself did not differ substantially depending on the chosen fermentation way (at the relative variation of 0–17%) and was at the level of 132–155 µg/ml. Using the approaches to the mathematical description of the fermentation process proposed by Kono-Asai and Luedeken-Piret, the authors confirmed their assumption that the accumulation of the target product is directly related to the concentration of biomass [24].

The further studies by these scientists who estab-

lished the following patterns of PPP synthesis by the strain *H. influenzae* type b GB 3291 and were able to substantially increase its productivity are also interesting [25]. The biosynthesis of the polysaccharide is significantly influenced by pH regulation: maintaining the pH at a neutral level (7.2 ± 0.2) allows increasing the yield of PRP. Thus, the synthesis of the antigen continued and increased with pH regulation and attainment to the stationary growth phase, in contrast to the variant without pH regulation, where the increase of antigen amount was observed only in the exponential growth phase. The cells rapidly catabolized feed in the form of glucose (with pH adjustment) with the simultaneous synthesis of biomass and antigen. When the culture reached the stationary growth phase, glucose consumption slowed down, but the synthesis of the polysaccharide was actively continued. At the same time, after reaching the stationary growth phase (10 h), the feed was directly converted into a polysaccharide (under the condition of pH regulation). In addition, it was shown that the amount of synthesized polysaccharide was 943.3 µg/ml when the oxygen saturation was 30% with pH control. The amount of synthesized polysaccharide was 124% higher than the traditional synthesis with unchanged aeration (420.8 µg/ml). Maintaining the partial pressure and pH at a certain level led to an elongation of the exponential and stationary growth phases and, correspondingly, to an increase of PRP formation. The authors suggest that pH regulation and the maintenance of aeration at a certain level also positively influence the expression of genes which are responsible for the synthesis of the capsular polysaccharide [25].

Modern world trends require that biotechnologists should develop new approaches to the selection of a growth medium for the cultivation of producers, especially those that require components of animal origin for their activity. *H. influenzae* type b also relates to such microorganisms, for the cultivation of which media with animal components are often used (e.g. brain-heart infusion medium, chocolate agar with blood, peptones of the animal origin). In addition, gem is the growth factor of *H. influenzae* type b [26, 27], which is necessarily introduced into the growth medium in the form of a solution of hemin chloride. Therefore, increasingly frequently scientists pay attention to the selection of alternative growth medium based on plant components, for example, peptones. Thus, most of the modern patents relating to the biosynthesis of PRP of *H. influenzae* type b are devoted to the selection of the optimal composition of such growth medium.

The information about the component composition of the growth medium containing inorganic salts, glucose, yeast extract, some amino acids, hemin and NAD, as well as peptone of plant origin is provided in patent [28]. It was found out that the amount of polysaccharide collected from 700 liters of culture liquid was 70–80 g when a strain *H. influenzae* type b CS 68 was grown on this growth medium.

A modified soybean-peptone medium with a yeast

extract and an optimized concentration of hemin (30 mg/l) and NAD (15 mg/l) was described in one of the works [29]. The synthesis of PRP increased up to 980 µg/ml under conditions of forced aeration and pH control.

In addition to screening the optimal composition of the growth medium, scientists pay special attention to the selection and receiving of highly active PRP producers. Thus, in the patent [30] the authors described a heterogeneous population of *H. influenzae* serotype b, which contains encapsulated and noncapsulated bacteria. It was shown that white and gray colonies, significantly different in productivity, were distinguished after 18–24 h of cultivation on selective solid nutrient media. Thus, white colonies synthesized 3–5 times more PRP compared to gray colonies and their productivity persisted for 4 generations. A synthetic solid nutrient medium containing plant peptone, yeast extract, inorganic salts, carbohydrates, growth factors, was proposed for the selective isolation of highly productive white colonies. The scientists suggested that the cells forming white colonies contained at least two locuses, which were responsible for the synthesis of the target antigen [30].

The authors of another patent [31] used a strain with similar genetic characteristics. They examined the encapsulated strain *H. influenzae* type b, containing at least two copies of the locus (the size between 17 and 18 kDa) in the genetic code that group together the genes responsible for the synthesis and expression of the polysaccharide capsule. Using the chemical medium proposed in the patent made it possible to obtain a stable strain in 20 generations. The scientists conducted significant work studying the influence of the constituent composition of the growth medium on the PRP biosynthesis, as well as on the selection of components of non-animal origin for its composition [31]. During the selection of a growth medium, the researchers excluded proteins from its composition, which, in their opinion, greatly facilitates the purification of the target product and eliminates using of an antifoam agent. It has been established that a range of amino acids must be present in the growth medium for the cultivation of the studding strain, while the possibility of regulation of the polysaccharide biosynthesis by the concentration of aspartic acid, asparagine and glutamine was shown [31]. The concentration of these amino acids was chosen in such a way as to direct the metabolism of the cell to the production of the capsular polysaccharide. In addition, the positive effect of a range of vitamins in the growth medium on the production of the target product is described in patent [31].

During the replacement of animal components in the growth medium for an alternative, the question arises of the source of the hemin for *H. influenzae* type b, for which this porphyrin is an indispensable growth factor. The replacement of animal-based hemin on disodium salt of protoporphyrin or synthetic protoporphyrin IX at concentrations of 0.25 and 2.0 mg/l is proposed in the patent [31].

Using mixtures of substrates for cultivation is an interesting approach to increasing the synthesis of biomass

or the target product [32, 33]. It has been shown that the strain described in the patent [31] is capable to catabolize glucose, fructose, galactose, glycerol, xylose, ribose, fucose, sialic acid and lactate, and two or more carbon sources, such as glucose (12–16 g/l) and lactate (0.5–10 g/l), can be used for its cultivation. In our opinion, the study of this issue and work in this direction can be promising.

In addition, an important factor influencing the biosynthesis of the target product is the carbon/nitrogen ratio in the growth medium [34, 35]. Thus, it is emphasized in the patent [31] that the ratio of peptone and yeast extract should be more or equal to 1, and the content of total nitrogen – more than 0.8 g/l.

The authors of the work [36] studied the effect of dextrose and yeast extract concentration on the PRP synthesis of *H. influenzae* type b ATCC No. 10211. Two growth mediums were modified: the medium containing soy peptone and yeast extract (MP) as the main components, as well as the medium containing the casitone and yeast extract (CY) [37]. The modification consisted of a variation in the concentration of dextrose and yeast extract in the range 0–10 and 0–7.5 g/l, respectively. Experiments on the selection of the optimal concentration of the carbon and nitrogen source were carried out in Erlenmeyer flasks containing 1.0 L of the growth medium of the corresponding variant on a shaker incubator at 200 rpm at 37°C for 15 h. It was found out that the maximum PRP synthesis (453–511 mg/l) was observed at the concentration of dextrose and yeast extract 2.5 and 6 g/l, respectively, during the cultivation on MP medium. When the strain was cultured on a modified MP medium with a selected optimal concentration of yeast extract and glucose in a 50 l fermenter, the yield of the polysaccharide was 524 mg/l. Thus, it is necessary to take into account the C/N ratio when choosing the optimal composition of the growth medium for the cultivation of the producer.

The optimization of conditions for cultivation of *H. influenzae* type b using mathematical methods of planning was published in several articles [38]. Thus, Indian scientists selected the optimal composition of the growth medium for obtaining PRP using Plackett-Burman's plan [39]. It was found out that the maximum synthesis of the capsular polysaccharide (183 µg/ml) by the test strain was observed on a selected medium of the following composition (g/l): glutamate acid – 2, yeast extract – 15, cysteine – 0.008, dextrose – 7.5, NAD – 0.008, hemin – 0.02, NaCl – 4, NH₄Cl – 0.85, Na₂HPO₄ – 4.5, KCl – 0.11, MgSO₄ 7H₂O – 0.6. Some other authors used the central compositional plan and the methodology of the response surface to select the optimal values of external factors (temperature, pH, stirring speed) affecting the amount of generated biomass *H. influenzae* type b ATCC 10211 [40]. It was found out that at the temperature 35°C, a stirring 250 rpm and pH 8.5, the level of dry biomass was 5471 mg/l.

The results of improving the technology of obtaining PRP, as well as its scaling are presented in works [41, 42]. On a pilot scale (2 l of growth medium) the authors modified the medium based on casamino acids

and yeast extract, changing the concentration of glucose, yeast extract, hemin and NAD in its composition. Cultivation on a medium with an optimally selected composition of components allowed increasing the yield of PRP up to 1050 µg/ml, whereas when scaling to 50 l, maintaining the pH at 7.5 and partial pressure of oxygen 30%, the resulting polysaccharide concentration was 1160 µg/ml.

Russian scientists have proposed several variants of nutrient media for the cultivation of *H. influenzae* type b. Thus, in the patent belonging to Rostov Scientific Research Institute of Microbiology and Parasitology [43], a fairly simple growth medium based on casamino acids is described. Other authors took Klein's medium with the addition of NAD and hemin (synthetic medium) and insertion of casein peptone and glucose (semisynthetic medium) as a basis [44]. It was found out that the productivity of strain 326 on a synthetic and semisynthetic medium was 90–150 µg/ml and 80–130 µg/ml, respectively. Synthetic and semisynthetic growth medium (based on aminopeptide) for the cultivation of strain 267 (Mech No. 1) was also used by the authors of the patent [45] belonging to Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera. Another patent [46] describes the composition of a growth medium for cultivating *H. influenzae* type b which advantage is its low cost. The composition of the growth medium includes 11 components (in g/l: NaCl – 5.8; MgCl₂ – 0.2; CaCl₂ – 0.022; KH₂PO₄ – 2.720; K₂HPO₄ – 3.480; glucose – 5.000; hemin – 0.01; NAD – 0.004; calcium pantothenate – 0.004; thiamine – 0.004 ml; aminopeptide – 300 ml), and its preparation includes 8 stages. The details of the cultivation of *H. influenzae* type b on semisynthetic and synthetic medium are described in the articles of this author's collective [47, 48], and the regularities in

the synthesis of polysaccharide and biomass in these media, depending on the concentration of growth factors, are given in the work [49]. It was found out that increasing the concentration of hemin and NAD led to increasing the amount of biomass, but the amount of synthesized PRP was reduced.

The data on the conditions of cultivation of various strains of *H. influenzae* type b and quantifies the PRP biosynthesis are summarized in the table.

As it is seen from the data given in the table, various mostly semisynthetic growth media, different in composition, are used for the PRP biosynthesis by *H. influenzae* type b strains. As a result of optimization of their composition and scaling the technological step of cultivation for fermentation equipment, the synthesis of PRP for some strains was increased to 1000 µg/ml. It should be noted that in the domestic literature sources available to us, the maximum rate of the PRP synthesis is 130–150 µg/ml.

Conclusion. Analysis of the literature data has shown that the selection of the optimum growth medium composition (concentration of carbon, nitrogen (their ratio), growth factors) and the cultivation conditions themselves (necessity of feed addition, pH) allows achieving the maximum biosynthesis of capsular polysaccharide polyribosylribitol phosphate of *H. influenzae* type b and reducing the time of cultivation as a technological step of PRP production. In addition, it is necessary to take into account the economic component of the technological process. The results of this work will be taken into account in carrying out experimental work on the selection of the growth medium and conditions for cultivation of *H. influenzae* type b B-7884 strain both in the development of technology under laboratory conditions and in its scaling in pilot production.

Table 1 – PRP synthesis, depending on conditions of cultivation of *H. influenzae* type b strains

Strain	Growth medium	Cultivation method	Productivity, µg/ml	Reference
Mad	Brain heart infusion and trypticase-soybean basic medium	Not indicated	72.6	[16]
GB 3291	Soy peptone – 10.0 g, yeast extract dialysate – 5.0 g, K ₂ HPO ₄ – 2.5 g, Na ₂ HPO ₄ – 13.1 g, NaH ₂ PO ₄ – 3.3 g, glucose – 5.0 g, hemin chloride – 10.0 mg, NAD – 10.0 mg, distilled water – up to 1 l. Maintain the pH at 7.5 with 5.0 N NaOH	In a 13 l fermenter, the working volume of the growth medium is 7.4 l, the stirring speed is 100–600 rpm, 37°C, and the air supply rate is 2 l/min. Regulation of pH was not carried out	155.0	[24]
GB 3291	Soy peptone – 10.0 g, yeast extract dialysate – 5.0 g, K ₂ HPO ₄ – 2.5 g, Na ₂ HPO ₄ – 13.1 g, NaH ₂ PO ₄ – 13.1 g, NaH ₂ PO ₄ – 3.3 g, glucose – 5.0 g, hemin chloride – 30.0 mg, NAD – 15.0 mg, distilled water – up to 1 l. Maintain the pH at 7.2 with 5.0 M NaOH	In a 13 l fermenter, the working volume of the growth medium is 7.4 l, the stirring speed is 100–600 rpm, 37°C, the air supply rate is 0.25 air volume/volume of the growth medium per minute, the air saturation at the level 30%, maintaining the pH at 7.2	943.3	[25]

Table 1 continued

Strain	Growth medium	Cultivation method	Productivity, µg/ml	Reference
ATCC 35540 (Hib(5s))	Brain heart infusion with additives of 1% solution of hemoglobin and 1% solution of Isovitalex (contains NAD, vitamins and microelements)	In the flasks on shaker for 24 hours at 37°C in the presence of 5–10% CO ₂	321.0	[23]
ATF2 (ATCC 10210)	Pancreatic digest of casein – 7.5 g, peptic digest of animal tissue – 7.5 g, corn starch – 1.0 g, K ₂ HPO ₄ – 4.0 g, KH ₂ PO ₄ – 1.0 g, NaCl – 5.0 g, glucose – 5.0 g, water – up to 1 l, further added hemin – 10 mg/ml and IsovitaleX, containing 0.01/ml of NAD	In the flasks on shaker for 24 hours at 37 °C in the presence of 5–10% CO ₂ , pH 7.5	192.0	[22]
Mad	Casamino acids – 1%, yeast extract dialysate – 0.5%, NaCl and sodium phosphate buffer according to the formulation. Additions in the form of prepared horse blood in the amount of 1/1000 and III NAD in the amount of 1 µg/ml	Not indicated	133.0 (on pentose of PRP)	[16]
Not indicated	Glutamic acid – 2.0 g, yeast extract – 15.0 g, cysteine – 0.008 g, dextrose – 7.5 g, NAD – 0.008 g, hemin – 0.02 g, NaCl – 4.0 g, NH ₄ Cl – 0.85 g, Na ₂ HPO ₄ – 4.5 g, KCl – 0.11 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0.6 g, water – up to 1 l	6 l fermenter	180.0–183.0	[39]
A760705	L-glutamic acid – 1.3 g, Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O – 2.5 g, KCl – 0.09 g, NaCl – 6.0 g, NH ₄ Cl – 1.25 g, yeast extract – 10 g, cysteine – 0.015 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0.6 g, dextrose – 5.0 g, hemin – 0.005 g, NAD – 0.002 g, water – up to 1 l	Fermenter with a working volume of 40 l, aeration rate of 5 l per min, air saturation of 30%, stirring speed of 300–700 rpm, pH 7.0	480.0	[17]
Heterogeneous population (the productive white colonies were selected)	3-NAD – 5.0 mg, protoporphyrin IX – 1.0 mg, glucose – 20.0 g, yeast extract – 5.0 g, pea peptone – 7.42 g, sodium lactate in 60% aqueous solution – 1.49 ml, cystine – 0.07 g, tryptophan – 0.02 g, Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O – 31.14 g, NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O – 2.03 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0.4 g, CaCl ₂ · 2H ₂ O – 0.02 g, (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1 g, water – up to 1 l	1 l fermenter, at (37 ± 1)°C, stirring, pressure 0.1 bar, pO ₂ – 30%, speed of air supply – 0.25 volume of air/volume of growth medium per min	719.0–904.0	[30]
ATCC10211	Casamino acids – 10.0 g/l, yeast extract dialysate – 2.5 g/l, glucose – 6.0 g/l, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.6. In addition on 1 l of growth medium was added NAD (0.015 g) and hemin (0.03 g)	In flasks (volume of fermentation broth – 2 l), at 36.5°C, 250 rpm, with a feeding solution of glucose and yeast extract	1050.0	[42]
		In 50 l fermenter, at the temperature of 36.5°C; the air supply rate is 0.6–0.8 air volume/volume of the nutrient medium per minute, stirring is 400–900 rpm, pH is 7.3, the air saturation is 30%, with a feeding solution of glucose and yeast extract	1160.0	
	The medium containing Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , NAD, hemin, soy peptone, yeast extract – 2.5 g/l, dextrose – 6 g/l	In flasks (volume of fermentation broth – 1 l), at 37°C, 200 rpm	453.0–511.0	[36]
		In a 50 l fermenter	524.0	

Table 1 continued

Strain	Growth medium	Cultivation method	Productivity, µg/ml	Reference
A capsular strain containing at least 2 copies of the locus in the genetic code	60% sodium lactate – 1.5 ml/l, K_2HPO_4 – 300 mg/l, KH_2PO_4 – 300 mg/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 368 mg/l, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 28620 mg/l, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ – 1870 mg/l, L-arginine – 87 mg/l, L-alanine – 134 mg/l, L-asparagine – 198 mg/l, L-lysine – 140 mg/l, L-glutamine – 220 mg/l, L-histidine – 78 mg/l, L-tryptophan – 200 mg/l, L-valine – 115 mg/l, L-isoleucine – 130 mg/l, L-leucine – 130 mg/l, L-tyrosine – 180 mg/l, L-phenylalanine – 165 mg/l, L-cystine – 61 mg/l, L-aspartic acid – 1065 mg/l, L-glutamic acid – 1471 mg/l, pyridoxine HCl – 4 mg/l, riboflavin – 0.2 mg/l, thiamine HCl – 4 mg/l, biotin – 4 mg/l, calcium pantothenate – 4.5 mg/l, uracil – 70 mg/l, hypoxanthine – 20 mg/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2.5 mg/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 20 mg/l, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 1 mg/l, $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 5 mg/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 13 mg/l, the final pH is 7.2 ± 0.1 (adjusting with 10 N KOH solution) Additionally added: glucose – 512.8 g/l, solution of NAD, protoporphyrin – 0.25 g/l, ammonium hydroxide – 5 ml/l	In a 1000 l fermenter, at the temperature $(32 \pm 1)^\circ C$, pH (6.7 ± 0.2) (adjusting 2.5 N sodium hydroxide solution), pO_2 was maintained at 70% by cascading the stirring speed (from 100 up to 230 rpm), aeration increase (from 70 to 150 l/min), flow rate O_2 from 0 to 500 l/min. As necessary, antifoaming agent (4% Biospumex solution) was added	865.0	[31]
CS 68	L-glutamic acid – 1.5 g/l, ammonium sulfate – 1.25 g/l, Sodium phosphate dibasic dihydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) – 11.0 g/l, Sodium phosphate monobasic dihydrate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) – 3.3 g/l, yeast extract – 5 g/l, potassium chloride (KCl) – 100.0 mg/l, sodium chloride (NaCl) – 6 g/l, vegetable peptone extract – 10 g/l, NAD – 3.0 mg/l, hemin synthetic – 5.0 mg/l, glucose – 5.0 g/l, L-cysteine – 100 mg/l	At $37^\circ C$, the pH was maintained at 7.0	100.0–115.0	[28]
Eagan	Yeast extract – 5 g/l, casamino acids – 22.5 g/l, dibasic sodium phosphate – 14.4 g/l, dextrose – 5.59 g/l, hemin – 20 g, ammonium hydroxide (30%) – 0.1534 ml, 1% NAD – 0.6 ml	In a 40 l fermenter, 16–18 h	Data is not shown	[50]
B 423	Casamino acids broth – 10.0 g/l, glucose – 5.0 g/l, yeast extract dialysate – 2.0 g/l, hemin – 0.001 g/l, NAD – 0.008 g/l, vitamin B_{12} – 0.0005 g/l, pH 7.2–7.4.	In an atmosphere saturated with CO_2 , for 8–10 h	Data is not shown	[43]
326	The Klein medium with growth factors (hemin, NAD)	Fermenter of brand “Ankum” under conditions of forced aeration at $37^\circ C$, with constant stirring	90.0–150.0	[44]
	The Klein medium with growth factors (hemin, NAD), casein peptone – 20 g/l, glucose – 2 g/l		80.0–130.0	
267 (Mech №1)	Semisynthetic (based on aminopeptide) and synthetic growth medium	At $37^\circ C$ on a juggler at 200 rpm. The incubation was continued for 6 hours after the culture reached a stationary growth phase	50.0–100.0	[45]

Библиографический список

1. Almeida A.F., Trindade E., B. Vitor A., Tavares M. Haemophilus influenzae type b meningitis in a vaccinated and immunocompetent child // J Infect Public Health. 2017. No 10(3). P. 339–342. DOI: 10.1016/j.jiph.2016.06.001.
2. Sakata H., Adachi Y., Morozumi M., Ubukata K. Invasive Haemophilus influenzae infections in children in Kamikawa subprefecture, Hokkaido, Japan, 2006–2015: The effectiveness of H. influenzae type b vaccine // J Infect Chemother. 2017. No. 7. P. 459–462. DOI: 10.1016/j.jiac.2017.03.019.
3. Wood N., Menzies R., McIntyre P. Epiglottitis in Sydney before and after the introduction of vaccination against Haemophilus influenzae type b disease // Intern Med J. 2005. No. 35 (9). P. 530–535. DOI: 10.1111/j.1445-5994.2005.00909.x.
4. Slack M.P.E. A review of the role of Haemophilus influenzae in community-acquired pneumonia // Pneumonia. 2015. No. 6(1). P. 26–43. DOI.org/10.15172/pneu.2015.6/520.
5. Kelly D.F., Moxon E.R., Pollard A.J. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines // Immunology. 2004. No. 2. P. 163–174. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01971.x.
6. Briere E.C., Rubin L., Moro P.L., Cohn A., Clark T., Messonnier N. Prevention and control of Haemophilus influenzae type b disease: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP) // MMWR Recomm Rep. 2014. No. 63(RR-01). P. 1–14.
7. Davis S., Feikin D., Johnson H.L. The effect of Haemophilus influenzae type b and pneumococcal conjugate vaccines on childhood meningitis mortality: a systematic review // BMC Public Health. 2013. No. 13 Suppl. 3. P. 21. DOI: 10.1186/1471-2458-13-S3-S21.
8. Chongmelaxme B., Hammanee M., Phooaphirak W., Kotirum S., Hutubessy R., Chaikyapunapruk N. Economic evaluations of Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine: a systematic review // J Med Econ. 2017. No. 20(10). P. 1094–1106. DOI: 10.1080/13696998.2017.1359181.
9. Howie S.R., Oluwalana C., Secka O., Scott S., Ideh R.C., Ebruke B.E., Balloch A., Sambou S., Erskine J., Lowe Y., Corrah T., Adegbola R.A. The effectiveness of conjugate Haemophilus influenzae type b vaccine in the Gambia 14 years after introduction clinical infectious diseases // Clin Infect Dis. 2013. No. 57(11). P. 1527–34. DOI: 10.1093/cid/cit598.
10. Otczyk D.C., Cripps A.W. Vaccination for the control of childhood bacterial pneumonia – Haemophilus influenzae type b and pneumococcal vaccines // Pneumonia. 2013. No. 2(1). P. 2–15. DOI: 10.15172/pneu.2013.2/229.
11. Arvas A., Gur E., Bahar H., Torun M.M., Demirci M., Aslan M., Kocazeybek B. Haemophilus influenzae type b antibodies in vaccinated and non-vaccinated children // Pediatr Int. 2008. No. 50(4). P. 469–473. DOI: 10.1111/j.1442-200X.2008.02591.x.
12. World Health Organization: Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines // WHO Technical Report Series. 2000. N 897. URL: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/haemophilus/en/> (дата обращения: 01.08.2017).
13. Салимова Е.Л., Конон А.Д., Трухин В.П., Петровский С.В., Красильников И.В. Haemophilus influenzae SPB тип b В-7884 – производственный штамм полисахаридных вакцин // Актуальная биотехнология. 2016. № 3 (18). С. 77–81.
14. Трухин В.П., Петровский С.В., Красильников И.В., Начарова Е.П., Евтушенко А.Э., Салимова Е.Л., Конон А.Д., Уйба С.В. Штамм Haemophilus influenzae SPB тип в – высокоактивный продуцент капсульного полисахарида полирибозилрибитолфосфата // Пат. 2624014. Рос. Федерация N 2016113658; заявл. 08.04.2016; опубл. 30.06.2017, Бюл. N 19. 8 с.
15. da Silva M.R., Andreia Freixo Portela C., Maria Ferreira Albani S., Rizzo de Paiva P., Massako Tanizaki M., Zangirolami T.C. Experimental design and metabolic flux analysis tools to optimize industrially relevant Haemophilus influenzae type b growth medium // Biotechnol Prog. 2017. DOI: 10.1002/btpr.2546.
16. Anderson P., Pitt J., Smith D.H. Synthesis and release of polyribophosphate by Haemophilus influenzae type b in vitro // Infect Immun. 1976. No 13(2). P. 581–589.
17. Hamidi A., Beurret M.F.; De Staat Der Nederlanden, Vert. Door De Minister Van Vws. Process for producing a capsular polysaccharide for use in conjugate vaccines // Patent US 7582459 B2. United States. 2009 Sep 1.
18. Herriott R.M., Meyer E.Y., Vogt M., Modan M. Defined medium for growth of Haemophilus influenza // J Bacteriol. 1970. No. 101(2). P. 513–516.
19. Wolin H.L. Defined medium for Haemophilus influenzae type b // J Bacteriol. 1963. No. 85. P. 253–254.
20. Klein R.D., Luginbuhl G.H. Simplified media for the growth of Haemophilus influenzae from clinical and normal flora sources // J Gen Microbiol. 1979. No. 113(2). P. 409–411.
21. Artman M., Domenech E., Weiner M. Growth of Haemophilus influenzae in simulated blood cultures supplemented with hemin and NAD // J Clin Microbiol. 1983. No. 18(2). P. 376–379.
22. Esmaily F., Aminian M., Tavangar A.R., Hadi A. Comparison of bacterial biomass and PRP production between different isolates of Haemophilus influenza type b (Hib) under different culture conditions // Archives of Razi Institute. 2011. No. 66(1). P. 43–49. DOI: 10.22092/ari.2016.103865.
23. Torabi M., Haadi A., Asli E., Aminian M., Esmaily F., Afshar M., Hatami A. A study on Haemophilus influenzae

- type b growth rate and capsule production in different media // Archives of Razi Institute. 2012. No. 67(1). P. 7–12. DOI: 10.22092/ARI.2016.103881.
24. Takagi M., Cabrera-Crespo J., Baruque-Ramos J., Zangirolami T.C., Raw I., Tanizaki M.M. Characterization of polysaccharide production of Haemophilus influenzae type b and its relationship to bacterial cell growth // Appl Biochem Biotechnol. 2003. No. 110(2). P. 91–100.
 25. Takagi M., Zangirolami T.C., Tanizaki M.M., Cabrera-Crespo J. Improvement of simple cultivation conditions for polysaccharide synthesis by Haemophilus influenzae type b // Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. 2007. P. 602–608. DOI: 10.1002/jctb.1377.
 26. Cope L.D., Yogev R., Muller-Eberhard U., Hansen E.J. A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hemoexin by Haemophilus influenzae type b // J Bacteriol. 1995. No. 177(10). P. 2644–2653. DOI: 10.1128/jb.177.10.2644-2653.1995.
 27. Wong J.C., Holland J., Parsons T., Smith A., Williams P. Identification and characterization of an iron-regulated hemoexin receptor in Haemophilus influenzae type b // Infect Immun. 1994. No. 62(1). P. 48–59.
 28. Ella K.M., Ramasamy V., Naidu M.G., Sarma A.D. Bharat Biotech International Limited. Non-alcoholic vaccine compositions free from animal- origin and process for preparation thereof // World intellectual property organization WO 2014009971 (A2). 2014.
 29. Takagi M., Cabrera-Crespo J., Zangirolami T.C., Raw I., Tanizaki M.M. Improved cultivation conditions for polysaccharide production by H. influenzae type b // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2006. No. 81(2). P. 182–188. DOI: 10.1002/jctb.1377.
 30. Maitre-Wilmotte G., Speck D., Rokbi B.; Sanofi Pasteur Sa. Culture medium for Haemophilus influenzae type b // Patent US 8673617 B2. United States 2014 Mar 18.
 31. Hir J.L., Loubiere P., Barbirato F., Lindley N.; Sanofi Pasteur. Method for producing Haemophilus Influenzae type b antigens // Patent US 9556464 (B2). United States 2017 Jan 31.
 32. Babel W. Bewertung von Substraten für das mikrobielle Wachstum auf der Grundlage ihres Kohlenstoff/Energie-Verhältnisses // Z. Allg. Mikrobiol. 1979. No. 19. P. 671–677. DOI: 10.1002/jobm.19790190910.
 33. Hagman M., Nielsen J.L., Nielsen P.H., Jansen J.I. Mixed carbon sources for nitrate reduction in activated sludge-identification of bacteria and process activity studies // Water Res. 2008. No. 42(6-7). P. 1539–1546. DOI: //doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.034.
 34. Fonseca R.R., Silva A.J., De França F.P., Cardoso V.L., Sérvulo E.F. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a Bacillus subtilis strain // Appl Biochem Biotechnol. 2007. No. 137–140(1–12). P. 471–486. DOI: 10.1007/s12010-007-9073-z.
 35. Kuttiraja M., Douha A., Valéro J.R., Tyagi R.D. Elucidating the effect of glycerol concentration and C/N ratio on lipid production using Yarrowia lipolytica SKY7 // Appl Biochem Biotechnol. 2016. No. 180(8). P. 1586–1600.
 36. Nojoomi F., Nahid A.P. Effect of culture media and their ingredients on PRP production by Haemophilus influenza // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2014. No. 3(11). P. 920–925.
 37. Ronald M. Atlas Handbook of Microbiological Media. Third Edition: CRC Press; 2004.
 38. Hamidi A., Kreeftenberg H., Pol L.V.D., Ghimire S., Wielen L.A.V.D., Ottens M. Process development of a new Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine and the use of mathematical modeling to identify process optimization possibilities // Biotechnol Prog. 2016. No. 32(3). P. 568–580. DOI: 10.1002/btpr.2235.
 39. Yeruva S., Mantha S., Tirumalaraju A., Rokkam S.R. Screening of medium components for polyribosylribitol phosphate production by Haemophilus influenzae type-b using Plackett-Burman design // Journal of Cell & Tissue Research. 2010. No. 10(3). P. 2349–2352.
 40. Momen S.B., Siadat S.D., Akbari N., Ranjbar B., Khajeh K. Applying central composite design and response surface methodology to optimize growth and biomass production of Haemophilus influenzae type b // Jundishapur J Microbiol. 2016. No. 9(6). P. 25246. DOI: 10.5812/jjm.25246.
 41. Nojoomi F., Siadat S.D., Salmanian A.H., Khoramabadi N. Improvement of large-scale PRP production by Haemophilus influenzae type b, using modified CY medium // J Fasa Univ Med Sci. 2012. No. 1(4). P. 182–186.
 42. Arsang A., Tabatabaie A., Vaziri F., Nejati M., Zolfaghari M.R., Fateh A., Jamnani F.R., Bahrmand A.R., Siadat S.D. Optimization of large scale production of Haemophilus influenzae type b polyribosyl-ribitol phosphate // Minerva Biotechnologica. 2017. No. 29(1). P. 17–23. DOI: 10.23736/S1120-4826.16.01855-3.
 43. Яговкин Э.А., Вачаев Б.Ф., Шепелев А.П., Головина С.В., Алешня В.В., Медуницын Н.В., Чупрынина Р.П., Немировская Т.И., Храмова Н.И. Способ получения антигенного препарата Haemophilus influenzae типа b (Hib) // Пат. 2185191. Рос. Федерация N 2001102923/13; заявл. 01.02.2001; опублик. 20.07.2002, Бюл. N 20. URL: http://www1.fips.ru/fips_serv1/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2185191&TypeFile=html (дата обращения: 01.08.2017)
 44. Ванеева Н.П., Елкина С.И., Апарин П.Г. Штамм бактерий Haemophilus influenzae В № 326, стабильный продуцент капсульного полисахарида // Пат. 2465316 Рос. Федерация N 2011140336/10; заявл. 05.10.2011; опублик. 27.10.2012, Бюл. N 30. 5 с.
 45. Елкина С.И., Сергеев В.В., Ванеева Н.П., Апарин П.Г., Львов В.Л., Ястребова Н.Е., Орлова О.Е. Штамм

- Haemophilus influenzae В МЕСН №1 – продуцент капсульного полисахарида – полирибозилрибитолфосфата // Пат. 2257412. Рос. Федерация N 2004109822/13; заявл. 01.04.2004; опубл. 27.07.2005, Бюл. N 21. 4 с.
46. Елкина С.И., Ванеева Н.П., Апарин П.Г., Львов В.Л., Орлова О.Е., Ястребова Н.Е. Питательная среда для культивирования бактерий Haemophilus influenzae типа b // Пат. 2258737. Рос. Федерация N 2003126461/13; заявл. 20.02.2005; опубл. 20.08.2005, Бюл. N 23. 5 с.
47. Orlova O.E., Vaneeva N.P., L'vov V.L., Iastrebova N.E., Elkina S.I., Sergeev V.V., Kalina N.G., Zakharova N.E. Cultivation of Haemophilus influenzae, serotype B, in amino peptide-based semisynthetic nutrient medium // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2002. No.3. P. 56–58.
48. Orlova O.E. Dynamics of growth of Haemophilus influenzae serotype B and synthesis of capsular polysaccharide in the process of cultivation in a synthetic nutrient medium // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2002. No. 2. P. 75–77.
49. Orlova O.E., Elkina S.I., Iastrebova N.E., Vaneeva N.P., Sergeev V.V., Kalina N.G., Tokarskaia M.M. Influence of nicotinamide adenine dinucleotide and hemin concentrations on the growth of Haemophilus influenzae type b and the synthesis of capsular polysaccharide // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2005. No.4. P. 12–15.
50. Lance Gordon K., Connaught Lab. Haemophilus influenzae b polysaccharide exotoxoid conjugate vaccine / World intellectual property organization WO 8400300 (A1). 1984.

References

1. Almeida AF, Trindade E, B Vitor A, Tavares M. Haemophilus influenzae type b meningitis in a vaccinated and immunocompetent child. J Infect Public Health. 2017 May-Jun;10(3):339–42. DOI: 10.1016/j.jiph.2016.06.001.
2. Sakata H, Adachi Y, Morozumi M, Ubukata K. Invasive Haemophilus influenzae infections in children in Kamikawa subprefecture, Hokkaido, Japan, 2006–2015: The effectiveness of H. influenzae type b vaccine. J Infect Chemother. 2017 Jul;23(7):459–62. DOI: 10.1016/j.jiac.2017.03.019.
3. Wood N, Menzies R, McIntyre P. Epiglottitis in Sydney before and after the introduction of vaccination against Haemophilus influenzae type b disease. Intern Med J. 2005 Sep;35(9):530–5. DOI: 10.1111/j.1445-5994.2005.00909.x.
4. Slack MPE. A review of the role of Haemophilus influenzae in community-acquired pneumonia. Pneumonia. 2015;6(1):26–43. DOI.org/10.15172/pneu.2015.6/520.
5. Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. Immunology. 2004 Oct;113(2):163–74. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01971.x.
6. Briere EC, Rubin L, Moro PL, Cohn A, Clark T, Messonnier N. Prevention and control of Haemophilus influenzae type b disease: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2014 Feb 28;63(RR-01):1–14.
7. Davis S, Feikin D, Johnson HL. The effect of Haemophilus influenzae type b and pneumococcal conjugate vaccines on childhood meningitis mortality: a systematic review. BMC Public Health. 2013;13 Suppl 3:S21. DOI: 10.1186/1471-2458-13-S3-S21.
8. Chongmelaxme B, Hammanee M, Phooaphirak W, Kotirum S, Hutubessy R, Chaikunapruk N. Economic evaluations of Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine: a systematic review. J Med Econ. 2017 Oct;20(10):1094–106. DOI: 10.1080/13696998.2017.1359181.
9. Howie SRC, Oluwalana C, Secka O, Scott S, Ideh RC, Ebruke BE, Balloch A, Sambou S, Erskine J, Lowe Y, Corrah T, Adegbola RA. The effectiveness of conjugate Haemophilus influenzae type b vaccine in the Gambia 14 years after introduction clinical infectious diseases. Clin Infect Dis. 2013 Dec;57(11):1527–34. DOI: 10.1093/cid/cit598.
10. Otczyk DC, Cripps AW Vaccination for the control of childhood bacterial pneumonia – Haemophilus influenzae type b and pneumococcal vaccines. Pneumonia. 2013;2(1):2–15. DOI: 10.15172/pneu.2013.2/229.
11. Arvas A, Gur E, Bahar H, Torun MM, Demirci M, Aslan M, Kocazeybek B. Haemophilus influenzae type b antibodies in vaccinated and non-vaccinated children. Pediatr Int. 2008 Aug;50(4):469–73. DOI: 10.1111/j.1442-200X.2008.02591.x.
12. World Health Organization: Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series [Internet]. 2000. N 897. [cited 2017 Aug 01]. Available from: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/haemophilus/en/>
13. Salimova EL, Konon AD, Truhin VP, Petrovskii SV, Krasilnikov IV. Haemophilus influenzae SPB tip b V-7884 proizvodstvennyj shtamm polisaharidnyh vakcin [Haemophilus influenzae SPB type b V-7884 – master seed strain of polysaccharide vaccines]. Actual biotechnology. 2016;3(18):77–81. Russian.
14. Trukhin VP, Petrovskii SV, Krasilnikov IV, Nacharova EP, Yevtushenko AE, Salimova EL, Konon AD, Ujba SV, inventor; SHtamm Haemophilus influenzae SPB tip v vysokoaktivnyj producent kapsulnogo polisaharida poliribozilribitolfosfata [The Haemophilus influenzae SPB type b strain is a highly active producer of the capsular polysaccharide polyribosyl ribitol phosphate]. Russian Federation RU 2624014. 2017 Jun 30. Russian.
15. da Silva MR, Andreia Freixo Portela C, Maria Ferreira Albani S, Rizzo de Paiva P, Massako Tanizaki M, Zangirami TC. Experimental design and metabolic flux analysis tools to optimize industrially relevant Haemophilus influenzae type b growth medium. Biotechnol Prog. 2017 Aug 25. DOI: 10.1002/btpr.2546.

16. Anderson P, Pitt J, Smith DH. Synthesis and release of polyribophosphate by *Haemophilus influenzae* type b in vitro. *Infect Immun*. 1976 Feb;13(2):581–9.
17. Hamidi A, Beurret MF, inventor; De Staat Der Nederlanden, Vert. Door De Minister Van Vws, assignee. Process for producing a capsular polysaccharide for use in conjugate vaccines. United States patent. US 7582459 B2. 2009 Sep 1.
18. Herriott RM, Meyer EY, Vogt M, Modan M. Defined medium for growth of *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*. 1970 Feb;101(2):513–6.
19. Wolin HL. Defined medium for *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol*. 1963 Jan;85:253–4.
20. Klein RD, Luginbuhl GH. Simplified media for the growth of *Haemophilus influenzae* from clinical and normal flora sources. *J Gen Microbiol*. 1979 Aug;113(2):409–11.
21. Artman M, Domenech E, Weiner M. Growth of *Haemophilus influenzae* in simulated blood cultures supplemented with hemin and NAD. *J Clin Microbiol*. 1983 Aug;18(2):376–9.
22. Esmaily F, Aminian M, Tavangar AR, Hadi A Comparison of bacterial biomass and PRP production between different isolates of *Haemophilus influenza* type b (Hib) under different culture conditions. *Archives of Razi Institute*. 2011;66(1):43–9. DOI: 10.22092/ari.2016.103865.
23. Torabi M, Haadi A, Asli E, Aminian M, Esmaily F, Afshar M, Hatami A A study on *Haemophilus influenzae* type b growth rate and capsule production in different media. *Archives of Razi Institute*. 2012;67(1):7–12. DOI: 10.22092/ARI.2016.103881.
24. Takagi M, Cabrera-Crespo J, Barúque-Ramos J, Zangirolami TC, Raw I, Tanizaki MM. Characterization of polysaccharide production of *Haemophilus influenzae* type band its relationship to bacterial cell growth. *Appl Biochem Biotechnol*. 2003 Aug;110(2):91–100.
25. Takagi M, Zangirolami TC, Tanizaki MM, Cabrera-Crespo J. Improvement of simple cultivation conditions for polysaccharide synthesis by *Haemophilus influenzae* type b. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 2007:602–8. DOI: 10.1002/jctb.1377.
26. Cope LD, Yogev R, Muller-Eberhard U, Hansen EJ. A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme: hemopexin by *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol*. 1995 May;177(10):2644–53. DOI: 10.1128/jb.177.10.2644-2653.1995.
27. Wong JC, Holland J, Parsons T, Smith A, Williams P. Identification and characterization of an iron-regulated hemopexin receptor in *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun*. 1994 Jan;62(1):48–59.
28. Ella KM, Ramasamy V, Naidu MG, Sarma AD, inventor; Bharat Biotech International Limited, assignee. Non-alcoholic vaccine compositions free from animal-origin and process for preparation thereof. World intellectual property organization WO 2014009971 (A2). 2014 Jan 16.
29. Takagi M, Cabrera-Crespo J, Zangirolami TC, Raw I, Tanizaki MM Improved cultivation conditions for polysaccharide production by *H. influenzae* type b. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2006;81(2):182–8. DOI: 10.1002/jctb.1377.
30. Maitre-Wilmotte G, Speck D, Rokbi B, inventor; Sanofi Pasteur Sa, assignee. Culture medium for *Haemophilus influenzae* type b. United States patent US 8673617 B2. 2014 Mar 18.
31. Hir JL, Loubiere P, Barbirato F, Lindley N, inventor; Sanofi Pasteur, assignee. Method for producing *Haemophilus Influenzae* type b antigens. United States patent US 9556464 (B2). 2017 Jan 31.
32. Babel W. Bewertung von Substraten für das mikrobielle Wachstum auf der Grundlage ihres Kohlenstoff/Energie-Verhältnisses. *Z. Allg. Mikrobiol*. 1979;19:671–7. DOI: 10.1002/jobm.19790190910.
33. Hagman M, Nielsen JL, Nielsen PH, Jansen JI. Mixed carbon sources for nitrate reduction in activated sludge-identification of bacteria and process activity studies. *Water Res*. 2008 Mar;42(6-7):1539–46. DOI: //doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.034.
34. Fonseca RR, Silva AJ, De França FP, Cardoso VL, Sérvulo EF. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. *Appl Biochem Biotechnol*. 2007 Apr;137-140(1-12):471–86. doi: 10.1007/s12010-007-9073-z.
35. Kuttiraja M, Douha A, Valéro JR, Tyagi RD. Elucidating the effect of glycerol concentration and C/N ratio on lipid production using *Yarrowia lipolytica* SKY7. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016 Dec;180(8):1586–600.
36. Nojoomi F, Nahid AP. Effect of culture media and their ingredients on PRP production by *Haemophilus influenzae*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2014;3(11):920–5.
37. Ronald M Atlas Handbook of Microbiological Media. Third Edition: CRC Press; 2004.
38. Hamidi A, Kreeftenberg H, V D Pol L, Ghimire S, V D Wielen LA, Ottens M Process development of a new *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine and the use of mathematical modeling to identify process optimization possibilities. *Biotechnol Prog*. 2016 May;32(3):568–80. DOI: 10.1002/btpr.2235.
39. Yeruva S, Mantha S, Tirumalaraju A, Rokkam SR Screening of medium components for polyribosylribitol phosphate production by *Haemophilus influenzae* type-b using Plackett-Burman design. *Journal of Cell & Tissue Research*. 2010 Dec;10(3):2349–52.
40. Momen SB, Siadat SD, Akbari N, Ranjbar B, Khajeh K Applying central composite design and response surface

- methodology to optimize growth and biomass production of Haemophilus influenzae type b. Jundishapur J Microbiol. 2016 Mar 1;9(6):e25246. DOI: 10.5812/jjm.25246.
41. Nojoomi F, Siadat SD, Salmanian AH, Khoramabadi N. Improvement of large-scale PRP production by Haemophilus influenzae type b, using modified CY medium. J Fasa Univ Med Sci. 2012;1(4):182–6.
 42. Arsang A, Tabatabaie A, Vaziri F, Nejati M, Zolfaghari MR, Fateh A, Jamnani FR, Bahrmand AR, Siadat SD. Optimization of large scale production of Haemophilus influenzae type b polyribosyl-ribitol phosphate. Minerva Biotechnologica. 2017 March;29(1):17–23. DOI: 10.23736/S1120-4826.16.01855-3.
 43. Yagovkin EA, Vachaev BF, Shepelev AP, Golovina SV, Aleshnya VV, Medunitsyn NV, Chuprynina RP, Nemirovskaya TI, Khranova NI, inventor. Sposob polucheniya antigennogo preparata Haemophilus influenzae tipa b (Hib) [A method for producing an Haemophilus influenzae type b (Hib) antigenic preparation]. Russian Federation RU 2185191. [Internet] 2002 Jul 20. [cited 2017 Aug 01]. Available from: http://www1.fips.ru/fips_servl/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2185191&TypeFile=html. Russian.
 44. Vaneeva NP, Elkina SI, Aparin PG, inventor. SHtamm bakterij Haemophilus influenzae V 326 stabilnyj producent kapsulnogo polisaharida [Strain of bacteria Haemophilus influenzae B No. 326, stable producer of capsular polysaccharide]. Russian Federation RU 2465316. 2012 Oct 27. Russian.
 45. Elkina SI, Sergeev VV, Vaneeva NP, Aparin PG, Lvov VL, Yastrebova NE, Orlova OE, inventor. SHtamm Haemophilus influenzae B MECH No 1 producent kapsulnogo polisaharida poliribozilribitolfosfata [Strain Haemophilus influenzae B MECH No. 1 – producer of capsular polysaccharide – polyribosylribitol phosphate]. Russian Federation RU 2257412. 2005 Jul 27. Russian.
 46. Elkina S.I, Vaneeva NP, Aparin PG, Lvov VL, Orlova OE, Yastrebova NE, inventor. Pitatel'naya sreda dlya kultivirovaniya bakterij Haemophilus influenzae tipa b [A growth medium for the cultivation of Haemophilus influenzae type b bacteria]. Russian Federation RU 2258737. 2005 Aug 20. Russian.
 47. Orlova OE, Vaneeva NP, L'vov VL, Iastrebova NE, Elkina SI, Sergeev VV, Kalina NG, Zakharova NE Cultivation of Haemophilus influenzae, serotype B, in amino peptide-based semisynthetic nutrient medium. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2002 May–Jun;(3):56–8.
 48. Orlova OE Dynamics of growth of Haemophilus influenzae serotype B and synthesis of capsular polysaccharide in the process of cultivation in a synthetic nutrient medium. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2002 Mar–Apr;(2):75–7.
 49. Orlova OE, Elkina SI, Iastrebova NE, Vaneeva NP, Sergeev VV, Kalina NG, Tokarskaia MM. Influence of nicotinamide adenine dinucleotide and hemin concentrations on the growth of Haemophilus influenzae type b and the synthesis of capsular polysaccharide. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2005 Jul–Aug;(4):12–5.
 50. Lance Gordon K, inventor; Connaught Lab, assignee. Haemophilus influenzae b polysaccharide exotoxoid conjugate vaccine. World intellectual property organization WO 8400300 (A1). 1984 Feb 2.

Благодарности. Авторский коллектив выражает благодарность заместителю директора по научной работе ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, д.м.н. Игнатьеву Георгию Михайловичу за помощь в написании статьи, а также за ценные советы и замечания.

Acknowledgments. The authors' team expresses gratitude to the deputy director of scientific work of FSUE SPbNIIVS FMBA of Russia, MD, professor Georgy M. Ignatiev for helping in writing the article, as well as for valuable advice and comments.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы:

Салимова Елена Леонидовна – начальник цеха «Комбинированные вакцины» Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, получение субстанций, выделение активного вещества. E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

Конон Анастасия Дмитриевна – кандидат технических наук, ведущий инженер-технолог цеха «Комбинированные вакцины» Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производ-

Autors:

Salimova Elena Leonidovna – head of the department “Combined Vaccines” of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, obtaining of substances, isolation of active substance. E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

Konon Anastasiia Dmitrievna – Candidate of Sciences (Engineering), leading process engineer of the department “Combined Vaccines” of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for

ству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, получение субстанций, выделение активного вещества. E-mail: a.d.konon@spbniivs.ru

Петровский Станислав Викторович – первый заместитель директора Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, технологии вирусных вакцин.

Трухин Виктор Павлович – директор Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, технологии вирусных вакцин.

Красильников Игорь Викторович – доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по международным отношениям Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, технологии вирусных вакцин, рекомбинантные вакцины. E-mail: i.v.krasilnikov@spbniivs.ru

the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, obtaining of substances, isolation of active substance. E-mail: a.d.konon@spbniivs.ru

Petrovskii Stanislav Viktorovich – first deputy director of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, technologies of viral vaccines.

Truhin Viktor Pavlovich – director of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, technologies of viral vaccines.

Krasilnikov Igor Viktorovich – Doctor of Sciences (Biology), professor deputy director for international relations of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, technologies of viral vaccines, recombinant vaccines. E-mail: i.v.krasilnikov@spbniivs.ru

Поступила в редакцию: 07.09.2017

Отправлена на доработку: 20.09.17

Принята к печати: 28.09.2017

Received: 17.09.2017

Sent back for revision: 20.09.2017

Accepted for publication: 28.09.2017