

Теоретическое и экспериментальное обоснование перспективных методов экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой

И. В. Касина*, С. А. Алексеева, Т. И. Немировская

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Вакцинация против сибирской язвы проводится в соответствии с национальным Календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Для иммунизации людей применяется живая вакцина, представляющая собой лиофилизированную взвесь спор вакцинного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1 в стабилизирующей среде. Усовершенствование контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов посредством внедрения современных стандартных методов контроля является актуальной и неотъемлемой частью системы менеджмента качества. **Цель работы:** совершенствование экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» и «Специфическая активность» (общая концентрация спор). **Материалы и методы:** испытание по показателям качества «Подлинность» и «Специфическая активность» (общая концентрация спор) проводили на образцах вакцины сибиреязвенной живой серии 266 производства ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Исследование иммунохроматографическим методом показателя качества вакцины «Подлинность» проводили с помощью набора реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы «ИХ тест-система *B. anthracis*» производства ФГБУ «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора (г. Оболensk); контроль показателя качества вакцины «Специфическая активность» (общая концентрация спор) проводили визуальным и расчетным методами с применением камеры Горяева и отраслевого стандартного образца (ОСО) мутности бактериальных взвесей 10 МЕ — ОСО 42-28-85 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); испытание по показателю качества «Специфическая активность» (количество живых спор) сибиреязвенной вакцины проводили микробиологическим методом (посевом на питательные среды). Статистическая обработка результатов была выполнена с помощью программы Microsoft Excel и Statistica 10.0. **Результаты:** теоретически обоснована и экспериментально доказана возможность применения иммунохроматографического метода как альтернативного для оценки показателя «Подлинность» вакцины сибиреязвенной живой. При проведении данного испытания препарат следует разводить до концентраций 10^8 и 10^9 м.к./мл. Разработана методика определения общей концентрации спор (показатель «Специфическая активность») вакцины сибиреязвенной живой с применением ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ. Предложена формула расчета общей концентрации спор в вакцине. **Вывод:** предложенные методики экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой могут быть рекомендованы для включения в нормативную документацию в качестве альтернативных. **Ключевые слова:** вакцина сибиреязвенная живая; *Bacillus anthracis* СТИ-1; подлинность; специфическая активность; общая концентрация спор *Bacillus anthracis* СТИ-1; концентрация живых спор; колониеобразующая единица (КОЕ); камера Горяева; ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ

Для цитирования: Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Теоретическое и экспериментальное обоснование перспективных методов экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(4):277–284. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-277-284>
* **Контактное лицо:** Касина Ирина Владимировна; kasina@exmped.ru

Theoretical and Experimental Substantiation of Alternative Methods for Quality Control of Live Anthrax Vaccine

I. V. Kasina*, S. A. Alekseeva, T. I. Nemirovskaya

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Preventive immunisation against anthrax is carried out in accordance with the national Immunisation Schedule for Epidemic Settings. The vaccination is performed using a live vaccine—a freeze-dried suspension of *Bacillus anthracis* STI-1 vaccine strain spores in a stabilizing media. Improvement of the quality control of immunobiological medicines is a pressing issue and an integral part of the quality management system. **The aim of study** was to streamline quality control of live anthrax vaccine in terms of the following test parameters: identification and specific activity (total spore concentration). **Materials and methods:** identification and specific activity (total spore concentration) tests were performed for samples of live anthrax vaccine, batch 266, produced by the 48 Central Scientific Research Institute. The identification test was performed using the *B. anthracis* immunochromatography test kit for express detection and identification of anthrax pathogen spores produced by the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (Obolensk). The specific activity (total spore concentration)

was assessed by the visual method and calculated in the Goryaev chamber using the industry reference standard of bacterial suspension turbidity equivalent to 10 IU—OSO 42-28-85 (by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products). The number of live spores in live anthrax vaccine was determined by the microbiological method (by inoculating media). The statistical processing of the results was performed using Excel and Statistica 10.0. **Results:** the authors provided theoretical and experimental substantiation to support the feasibility of using immunochromatography as an alternative identification test method for live anthrax vaccine. Test samples dilutions of 10^8 microbial cells per millilitre and 10^9 microbial cells per millilitre are used in the test. The authors developed a test procedure for determination of the total spore concentration (specific activity) in live anthrax vaccine using an industry reference standard of turbidity equivalent to 10 IU, and proposed a formula for calculation of the total spore concentration. **Conclusions:** the developed test procedures could be recommended for inclusion in the live anthrax vaccine specification files as alternative methods of quality control.

Key words: live anthrax vaccine; *Bacillus anthracis* STI-1; identification; specific activity; total spore concentration; live spore concentration; colony-forming unit (CFU); Goryaev chamber; industry reference standard of bacterial suspension turbidity equivalent to 10 IU

For citation: Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. Theoretical and experimental substantiation of alternative methods for quality control of live anthrax vaccine. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):277–284. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-277-284>

* **Corresponding author:** Irina V. Kasina; kasina@xpmmed.ru

Сибирская язва относится к зооантропонозам и является особо опасным инфекционным заболеванием. Эпидемические проявления сибирской язвы имеют большую социальную и экономическую значимость в связи с существованием естественных резервуаров сибиреязвенного микроба, которыми являются скотомогильники и стационарно неблагоприятные территории. Возбудитель сибирской язвы длительно сохраняется в почве не только жизнеспособность, но и вирулентность, что делает борьбу с сибирской язвой важной и долгосрочной задачей медицины и ветеринарии [1–4]. И в настоящее время эпидемиологическая обстановка по сибирской язве в России оценивается как напряженная и не имеющая тенденции к стабилизации. Спорадические случаи и эпидемические вспышки заболевания регистрируются постоянно [5]. Высокая патогенность сибиреязвенного микроба в сочетании с уникальной устойчивостью его спор к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды ставят его в разряд крайне опасных биологических агентов, используемых в качестве средства биотеррора [6]. В нашей стране надежной защитой населения от заражения сибирской язвой является вакцинопрофилактика [7–9]. Так, например, при отсутствии вакцинации и ревакцинации контингентов риска в 2018 г. в Российской Федерации на территориях республик Дагестан и Тыва вследствие контакта с больными животными были отмечены 3 случая заболевания сибирской язвой¹. Вакцинация против сибирской язвы проводится гражданам в соответствии с национальным Календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Вакцинации подлежат лица, работающие с живыми культурами возбудителя сибирской язвы, а также проводящие убой скота и выполняющие сельскохозяйственные, строительные, заготовительные, промысловые, геологические работы на энзоотичных по сибирской язве территориях. Для иммунизации людей применяется живая вакцина, представляющая собой лиофилизированную взвесь живых спор вакцинного штамма *Bacillus anthracis* STI-1 в стабилизирующей среде [7–9]. Первичная иммунизация проводится двукратно с интервалом 20–30 суток, ревакцинация — ежегодно однократно. Вакцина сибиреязвенная живая вызывает формирование специфического иммунитета продолжительностью до 1 года.

Контроль качества вакцины сибиреязвенной перед выпуском в гражданский оборот проводится с целью подтверждения соответствия показателей качества требованиям нормативной документации (НД)² на производстве и в отделе биотехнологического контроля (ОБТК) предприятия-производителя, а также в аккредитованном испытательном центре. Контроль качества вакцины осуществляется по всем показателям, предусмотренным требованиями НД для живых вакцин в лиофилизированной форме. К показателям качества, определяемым визуальными методами, относятся: описание, время растворения, показатели дисперсности суспензии; к физико-химическим показателям: рН, потеря в массе при высушивании, средняя масса и отклонения от средней массы; к биологическим: специфическая безопасность, иммуногенность для морских свинок; к микробиологическим: подлинность, отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов, специфическая активность (общая концентрация спор, количество живых спор).

Усовершенствование контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов посредством внедрения современных стандартных методов контроля является актуальной и неотъемлемой частью системы менеджмента качества [10, 11].

Цель работы — совершенствование экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность» (общая концентрация спор).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- теоретически обосновать применение перспективных методов экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность» (общая концентрация спор);
- экспериментальная оценка возможности применения иммунохроматографического метода в качестве альтернативного для оценки показателя «Подлинность» вакцины сибиреязвенной живой с использованием тест-системы иммунохроматографической;
- разработка методики определения показателя «Специфическая активность» (общая концентрация спор) вакцины сибиреязвенной живой с использованием отраслевого стандартного образца (ОСО) мутности бактериальных взвесей 10 МЕ.

¹ Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году». М.: Роспотребнадзор; 2019.

² Нормативная документация Р N001273/01-161019 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и кожного скарификационного нанесения.

Фармакопейная статья 3.3.1.0016.15 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и кожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Материалы и методы

Материалы:

- вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения, 100 подкожных или 10 накожных доз, серия 266 (общая концентрация — от 4 до 6 млрд спор/1 мл (по паспорту — 5,5 млрд спор/мл); вторая форма выпуска; ампульная форма) производства ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России;

- ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (ОСО 42-28-85П) (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), буква «П» означает год выпуска (ОСО мутности);

- мясо-пептонный агар (МПА) лабораторного приготовления, pH 7,2;

- набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы «ИХ тест-система *B. anthracis*» производства ФГБУ «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора (г. Оболensk) по ТУ 9398-093-78095326-2008 (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05485), срок годности 1 год.

Питательная среда для культивирования сибиреязвенного микроба предусмотрена требованиями НД.

Все препараты использованы в течение срока их годности.

Методы:

1. «ИХ тест-система *B. anthracis*» представляет собой пластиковую диагностическую панель (футляр) с лункой для внесения образца и с окошком для считывания результатов (рис. 1). Согласно инструкции по применению «ИХ тест-система *B. anthracis*» обеспечивает видоспецифическое выявление и идентификацию спор *B. anthracis* в суспензиях, полученных из колоний микроорганизмов, выращенных на «голодном» агаре в течение 10 сут при температуре 30–31 °С и в суспензиях, полученных из объектов внешней среды путем специальной пробоподготовки в концентрации 10⁸ спор/мл³. Вакцина сибиреязвенная представляет собой лиофилизированную взвесь живых спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 в стабилизирующей среде; соответственно, пробоподготовку исследуемого образца вакцины для получения спор не проводят. Исходя из указанной в паспорте на серию вакцины общей концентрации спор (5,5 млрд спор/мл), образец препарата разводили в 0,01 М натрий-фосфатном буферном растворе (pH 7,4) до концентрации 10⁹ спор/мл. Буферный раствор готовят *ex tempore*, стерилизация раствора не требуется. До концентрации 10⁸ спор/мл образец вакцины разводили по стандартному образцу мутности бактериальных взвесей 10 МЕ. Один образец дополнительно центрифугировали при 2000 об/мин в течение 2 мин, далее постановку теста и учет результатов осуществляли в соответствии с инструкцией по применению на набор «ИХ тест-система *B. anthracis*». Для этого приготовленные разведения препарата в объеме 0,1 мл вносили на диагностическую панель. Через 15–20 мин учитывали результат⁴.

Положительным результатом на присутствие спорowego сибиреязвенного антигена считали наличие видимых невооруженным глазом красных линий в зоне «С» и «Т», где зона «С» —

контрольная полоса, а зона «Т» — опытная полоса. При этом интенсивность цвета полос не учитывали. Интенсивность полос в зоне «С» и «Т» может отличаться. Об отрицательном результате свидетельствует наличие красной линии только в зоне «С». В связи с тем что в наши задачи не входило изучение специфичности набора «ИХ тест-система *B. anthracis*», так как он является зарегистрированным коммерческим препаратом с заявленной чувствительностью и специфичностью, контрольной пробой послужили не образцы других вакцин против особо опасных инфекционных заболеваний, а 0,01 М натрий-фосфатный буферный раствор, которым разводили образцы вакцины сибиреязвенной.

2. Определение общей концентрации спор. Параллельные исследования по определению общей концентрации спор в соответствии с НД⁵ с применением камеры Горяева и с помощью ОСО мутности 10 МЕ проводили на 10 различных образцах вакцины сибиреязвенной, в которых общая концентрация спор в соответствии с паспортом на серию составила 5,5 млрд спор/мл.

Вакцину восстанавливали в 1 мл стерильной дистиллированной воды.

В соответствии с НД⁶ общую концентрацию спор (ОК) в вакцине определяли путем их подсчета в камере Горяева и рассчитывали по формуле:

$$OK = 25000 \cdot n \cdot p, \quad (1)$$

где ОК — общее число спор в ампуле или флаконе в 1 мл; n — количество спор в 10 больших квадратах камеры Горяева; p — кратность разведения; 25000 — постоянная величина для камеры данного типа.

Исходя из полученной общей концентрации спор в образцах вакцины препарат разводили до концентрации 1000 спор в 1 мл и высевали по 0,1 мл на 5 чашек Петри с МПА (посевная доза составила условно 100 спор) для установления количества живых спор.

Чтобы определить общую концентрацию спор в вакцине по ОСО мутности, 0,1 мл восстановленного препарата вносили в стерильные пробирки, аналогичные тем, в которых выпускается ОСО мутности. Затем визуально доводили концентрацию дистиллированной водой до мутности 10 МЕ, что эквивалентно концентрации 1×10⁸ спор сибирской язвы/мл (в соответствии с инструкцией по применению на ОСО мутности). После этого десятикратными разведениями доводили до концентрации 1000 спор/мл и высевали по 0,1 мл на 3 чашки Петри с МПА. Посевная доза при этом также составила условно 100 спор в соответствии с методикой, указанной в НД.

3. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel. Статистическую значимость различий средних значений концентрации спор *B. anthracis* СТИ-1 в вакцине сибиреязвенной живой, полученной с помощью камеры Горяева и ОСО мутности бактериальных взвесей, оценивали с применением непараметрического U -критерия Манна — Уитни (программа Statistica 10.0).

Результаты и обсуждение

В соответствии с ОФС 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты⁷ подлинность лекарственного пре-

³ Диагностические препараты. Каталог продукции. ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора. Оболensk; 2018. https://www.obolensk.org/files/sredy/OBOLENSK_Katalog.pdf

⁴ Там же.

⁵ Нормативная документация Р N001273/01-161019 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения.

Фармакопейная статья 3.3.1.0016.15 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁶ Там же.

⁷ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2.; 2018.

парата определяется различными лабораторными методами (биологическими, иммунобиологическими, молекулярными, химическими и физико-химическими), позволяющими специфически идентифицировать лекарственный препарат. В соответствии с требованиями НД на вакцину⁸ сибирезвездную живую испытание по показателю «Подлинность» проводится при микроскопии мазка из восстановленного препарата, окрашенного по Цилю — Нильсену. В мазках должны наблюдаться овальные споры розового цвета с красным ободком по периферии. Метод основывается на различиях в устойчивости к красителям (карболовому фуксину и метиленовому синему) жизнеспособных и дефектных спор. В результате окрашивания жизнеспособные клетки приобретают розовый цвет с четким темно-красным ободком, а дефектные — темно-красный (рубиновый), в отдельных случаях вплоть до синего. Считаем, что данный метод объективно не отражает подлинность вакцины сибирезвездной, так как к роду *Bacillus* относятся и другие близкородственные микроорганизмы (например, *B. cereus*), имеющие округлые споры, диаметр которых не превышает ширину микробной клетки, и соответственно, также окрашиваются по Цилю — Нильсену [12]. Этот метод определения жизнеспособных спор в вакцине, на наш взгляд, является дополнительным к методу посева на питательные среды и обязательным на нескольких этапах производства вакцины при получении концентрированной споровой суспензии. Считаем, что для определения качества показателя «Подлинность» готовой лекарственной формы вакцины сибирезвездной живой необходим другой метод.

В лабораторной диагностике для обнаружения возбудителя сибирской язвы или его компонентов (ДНК, антигены) используются зарегистрированные диагностические наборы, основанные на методе флуоресцирующих антител, реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), иммунохроматографии, ПЦР,

чувствительности к фагам, реакции латекс-агглютинации и выделения чистых культур на питательных средах [13].

В последние 10 лет все большую популярность приобретают иммунохроматографические экспресс-тесты, которые позволили повысить чувствительность, специфичность и качество анализа; они широко применяются в медицине, лабораторной диагностике, в ветеринарии и сельском хозяйстве. Иммунохроматографический метод основан на принципе тонкослойной хроматографии и реакции между антигеном и соответствующим ему антителом, меченным цветной или флуоресцентной меткой. Проводится анализ с помощью специальных тест-полосок, панелей или тест-кассет. Основными преимуществами использования иммунохроматографических тест-систем являются:

- простота и удобство (позволяет получить результат без дополнительного оборудования);
- надежность (достоверность тестов достигает 92–99,8%, при этом каждый тест имеет встроенный внутренний контроль);
- экономичность (минимальные затраты на приобретение теста и экономия времени на проведение испытания)⁹.

ИХ-тесты также успешно применяются в лабораторной диагностике особо опасных инфекционных заболеваний, в том числе и сибирской язвы [14–16].

Нами в качестве альтернативного метода испытания вакцины сибирезвездной по показателю «Подлинность» был также выбран иммунохроматографический метод, который позволяет специфически идентифицировать сибирезвездный спорный антиген. Далее проведен анализ зарегистрированных на территории Российской Федерации иммунохроматографических тест-систем для диагностики возбудителя сибирской язвы.

В таблице 1 представлены отечественные и зарубежные разработки иммунохроматографических тест-систем.

Таблица 1. Отечественные и зарубежные разработки иммунохроматографических тест-систем для выявления антигенов возбудителя сибирской язвы

Table 1. Russian and foreign immunochromatography test kits for the detection of anthrax pathogen antigens

Наименование разработки Test kit	Производитель Manufacturer	Назначение разработки Intended use	Источник Source
Укладка УИХЭ-1	ФГУП «ГосНИИБП» ФМБА России	Для выявления антигенов возбудителя чумы, сибирской язвы, туляремии, сапа, биологических токсинов. Чувствительность — 1×10 ⁶ м.к./мл	Сноска ¹⁰
Panel of detection reagents for immunochromatography UIHE-1	State Research Centre for Biological Instrumentation Technology	Detection of antigens of the following pathogens: plague, anthrax, tularemia, equinia, and biological toxins. Sensitivity: 1×10 ⁶ MC/mL	Reference ¹⁰
Устройство RAMP	Response Biomedical Corp, Канада	Для выявления сибирской язвы (официально рекомендовано FDA), натуральной оспы, ботулотоксина, рицина. Чувствительность — 4×10 ³ спор/мл	Сноска ¹¹
Rapid analyte measurement platform (RAMP)	Response Biomedical Corp, Canada	Detection of anthrax (recommended by FDA), smallpox, botulinum toxin, ricin. Sensitivity: 4×10 ³ spores/mL	Reference ¹¹
Набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы («ИХ тест-система <i>B. anthracis</i> »)	ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора (г. Оболенск)	Для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы. Чувствительность — 1×10 ⁸ м.к./мл	Сноска ¹²
Immunochromatography test kit for express detection and identification of anthrax pathogen spores (<i>B. anthracis</i> IC test kit)	The State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (Obolensk)	Express detection and identification of anthrax pathogen spores. Sensitivity: 1×10 ⁸ MC/mL	Reference ¹²

Note. MC/mL—microbial cells per millilitre.

⁸ Там же.

⁹ Иммунохроматографические экспресс-тесты как оптимальное решение в условиях ограниченного бюджета. Главный врач юга России. 2019;4(68):12.

¹⁰ CBRN centre Qazaqstan. <https://cbrn.kz/ukladka-immunohromatograficheskikh-indikatornyh-elementov-uihe-1/>

¹¹ responsebio.com

¹² Диагностические препараты. Каталог продукции. ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора. Оболенск; 2018. https://www.obolensk.org/files/sredy/OBOLENSK_Katalog.pdf

Отечественные ИХ тест-системы просты и удобны в применении, так как в учете результатов применяется цветная метка. В зарубежных иммунохроматографических тест-системах используется флуоресцентная метка, для учета которой необходим специальный анализатор. В связи с тем что укладка УИХЭ-1 и ИХ тест-системы для устройства RAMP выпускаются в комплекте для идентификации нескольких возбудителей, соответственно, для экспертизы качества одной вакцины неудобны в применении.

В нашем исследовании вакцины сибиреязвенной по показателю качества «Подлинность» мы впервые применили зарегистрированный на территории Российской Федерации диагностический набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы «ИХ тест-система *B. anthracis*» производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора (г. Оболенск). Вакцина представляет собой лиофилизированную взвесь живых спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 в стабилизирующей среде, соответственно, пробоподготовка образцов для исследования занимает минимальное время.

Полученные результаты испытаний представлены на рисунке 2. Установлено, что в образцах вакцин в концентрации 10^9 спор/мл, подвергнутых и не подвергнутых центрифугированию, были отчетливо видны полосы, свидетельствующие о наличии сибиреязвенного спорового антигена. Более четкий результат получен с образцом вакцины с концентрацией 10^8 спор/мл, предварительно подвергнутый центрифугированию. Полученный результат, возможно, обусловлен наличием других компонентов (например, сахарозы), которые влияют на процесс обнаружения спор в образцах вакцины в концентрации 10^8 спор/мл. Таким образом, рекомендуемая нами концентрация вакцины сибиреязвенной живой для проведения испытания по показателю «Подлинность» составляет 10^9 спор/мл разведенной восстановленной формы или 10^8 спор/мл с предварительным центрифугированием пробы. В контроле получен отрицательный результат. Учитывая простоту и удобство, надежность и экономичность набор «ИХ тест-система *B. anthracis*» является эффективным экспресс-методом для видоспецифического выявления спор *B. anthracis* в образцах вакцины с концентрацией 10^8 и 10^9 спор/мл.

Одним из главных показателей качества вакцины сибиреязвенной живой является «Специфическая активность», обусловленная общей концентрацией спор и количеством живых спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1. В отличие от других бактериальных живых вакцин, таких как чумная, туляремиальная, бруцеллезная и туберкулезная¹³, в которых количество прививочных доз в ампуле определяется исходя из фактического содержания живых микробных клеток, в сибиреязвенной вакцине количество прививочных доз рассчитывается из общей концентрации спор. При этом количество живых спор должно составлять не менее 40% от общей концентрации и определяется методом посева на питательные среды.



Рис. 1. Набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы «ИХ тест-система *B. anthracis*». Fig. 1. Immunochromatography test kit for express detection and identification of anthrax pathogen spores (*B. anthracis* IC test kit).

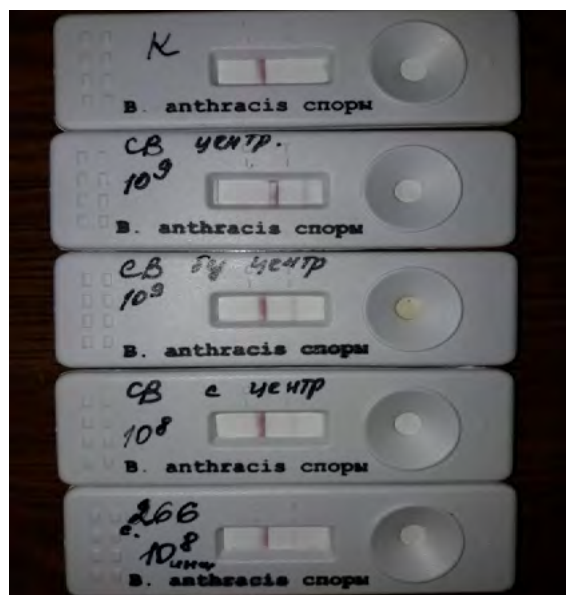


Рис. 2. Результаты испытаний вакцины сибиреязвенной живой с применением иммунохроматографической тест-системы *B. anthracis* по показателю «Подлинность». К — контроль (0,01 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7,4); CB_{центр} — проба вакцины сибиреязвенной живой, подвергнутая предварительному центрифугированию; CB_{без центр} — проба вакцины сибиреязвенной живой без предварительного центрифугирования; 266 — вакцина сибиреязвенная живая серии 266. Fig. 2. Results of the identification test for live anthrax vaccine that were obtained using the *B. anthracis* IC test kit. К—control (0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.4); CB_{центр}—pre-centrifuged sample of live anthrax vaccine; CB_{без центр}—non-centrifuged sample of live anthrax vaccine; 266—live anthrax vaccine batch 266.

¹³ Фармакопейная статья 3.3.1.0022.15 Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0019.15 Вакцина туляремиальная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0011.15 Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0018.15 Вакцина туберкулезная БЦЖ живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Таблица 2. Результаты испытания вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Специфическая активность» (общая концентрация спор, количество живых спор)

Table 2. Results of the specific activity test for live anthrax vaccine (total spore concentration, live spore concentration)

Номер образца Sample	Общая концентрация спор в вакцине ($n \times 10^9$ спор/мл), определенная... Total spore concentration in the vaccine ($n \times 10^9$ spores/mL) calculated using...		Среднее количество выросших колоний (КОЕ) из взвеси спор вакцины, приготовленной... Mean number of colonies (CFU) grown from the vaccine spore suspension prepared...		Расчетная концентрация живых спор в взвеси (%), приготовленной... Estimated concentration of live spores (%) in the suspension prepared...	
	по ОСО мутности 10МЕ the industry reference standard of turbidity equivalent to 10 IU	в камере Горяева (по НД) the Goryaev chamber (according to the product specification file)	по ОСО мутности 10 МЕ (~100 спор) using the industry reference standard of turbidity equivalent to 10 IU (~100 spores)	по НД (~100 спор) according to the product specification file (~100 spores)	по ОСО мутности 10 МЕ using the industry reference standard of turbidity equivalent to 10 IU	по НД according to the product specification file
1	4,4	4,5	73	51	73	51
2	4,0	4,0	43	36	43	36
3	5,5	6,0	77	41	77	41
4	4,3	4,3	64	60	64	60
5	4,0	4,0	49	54	49	54
6	4,5	4,8	64	38	64	38
7	5,0	4,9	55	45	55	45
8	4,3	4,6	76	63	76	63
9	4,1	4,0	40	40	40	40
10	4,0	4,4	58	46	58	46
Хсп ± S	4,41 ± 0,5	4,55 ± 0,6	60 ± 13	45 ± 12	60 ± 13	45 ± 12

Примечание. ОСО — отраслевой стандартный образец, НД — нормативная документация, 100 спор — проводили посев расчетных 100 спор.
Note. 100 spores—inoculation of estimated 100 spores.

В живых вакцинах против особо опасных инфекционных заболеваний, таких как чумная, туляреминая и бруцеллезная¹⁴, общая концентрация взвеси микробных клеток определяется по ОСО мутности 10 МЕ и затем рассчитывается по формуле с использованием коэффициента концентрации соответствующего микроба, указанного в инструкции по применению ОСО мутности бактериальных взвесей. С 2015 г. коэффициент концентрации взвеси спор сибиреязвенного микроба представлен в инструкции по применению ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ и соответствует $0,11 \times 10^9$ спор/мл [17].

Это позволило нам показать возможность проведения испытания вакцины сибиреязвенной по показателю «Специфическая активность» методом подсчета общей концентрации спор по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, как это принято в испытаниях других бактериальных живых вакцин. На основании представленной в ОФС 1.7.2.0008.15¹⁵ формулы подсчета бактериальной концентрации по ОСО мутности нами предложена формула (2) подсчета общей концентрации (ОК) спор в вакцине сибиреязвенной:

$$OK = \frac{(0,1 + n) (0,1 \times 10^9)}{0,1}, \quad (2)$$

где 0,1 — количество восстановленной вакцины в мл; n — объем воды очищенной, использованной для разведения пробы до мутности 10 МЕ, мл; $(0,1 \times 10^9)$ — эквивалент концентрации спор/мл сибиреязвенного микроба по ОСО мутности.

Общая концентрация спор во всех образцах вакцины, определенная по ОСО мутности бактериальной взвеси 10 МЕ (табл. 2), составляет $(4,41 \pm 0,5) \times 10^9$ спор/мл, при этом количество живых спор в ней — $60 \pm 13\%$. Количество живых спор, определенных по ОСО мутности, было в пределах нормируемых показателей — не менее 40% от общей концентрации спор. Общая концентрация спор, определенная с помощью камеры Горяева, составила $(4,55 \pm 0,6) \times 10^9$ спор/мл, а процент живых спор — $45 \pm 12\%$. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что концентрации спор, определенные в камере Горяева и по ОСО мутности, сопоставимы. Это подтвердил проведенный статистический анализ с применением непараметрического U -критерия Манна — Уитни: достигнутый уровень значимости $P_{\text{эмп}}$ составил 0,5967 и значительно превышал принятый критический уровень значимости 0,05. Таким образом, общие концентрации спор сибирской язвы в вакцине, рассчитанные с использованием ОСО мутности, статистически не отличались от концентраций, рассчитанных с помощью камеры Горяева.

При этом необходимо отметить недостатки использования камеры Горяева для определения общей концентрации спор в вакцине: неравномерное распределение спор по квадратам камеры, затруднение подсчета из-за слипания спор.

На основании результатов анализа полученных данных считаем, что определение общей концентрации спор готовой лекарственной формы вакцины сибиреязвенной живой по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ является более удоб-

¹⁴ Фармакопейная статья 3.3.1.0022.15. Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0019.15. Вакцина туляреминая живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0011.15. Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

¹⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

ным, объективным и информативным методом по сравнению с подсчетом в камере Горяева. В связи с этим метод расчета общей концентрации спор сибиреязвенного микроба с помощью ОСО мутности может быть рекомендован к включению в НД на вакцину сибиреязвенную живую в качестве альтернативного.

Выводы

Теоретически и экспериментально обоснованы перспективные методы экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой.

1. Проведен анализ существующих методов экспресс-диагностики сибирской язвы. Показано, что иммунохроматографический метод является эффективным экспресс-методом для видоспецифического выявления спор *B. anthracis* в вакцине сибиреязвенной живой. Экспериментально доказана возможность применения набора «ИХ тест-система *B. anthracis*» на основе иммунохроматографического метода как альтернативного для оценки качества по показателю «Подлинность» вакцины сибиреязвенной живой. При проведении данного испытания рекомендуемые концентрации вакцины составляют 10^8 и 10^9 спор/мл.

2. Предложена методика определения и формула расчета общей концентрации спор в показателе качества «Специфическая активность» вакцины сибиреязвенной живой с применением ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ. Показаны преимущества предложенного метода по сравнению с методом подсчета спор в камере Горяева.

3. Считаем, что предложенные методики являются перспективными для экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой и могут быть рекомендованы для внесения в нормативную документацию на вакцину сибиреязвенную живую в качестве альтернативных. Для внесения соответствующих изменений в нормативную документацию на вакцину сибиреязвенную живую производительно необходимо провести валидацию представленных методик.

Вклад авторов. *И. В. Касина* — идея, концепция и дизайн исследования, теоретическое обоснование выбранных методов оценки качества, экспериментальная работа по определению общей концентрации спор по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ в вакцине сибиреязвенной живой, обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов, написание текста и критический пересмотр его содержания; *С. А. Алексеева* — экспериментальная работа по определению показателя качества «Подлинность» вакцины сибиреязвенной живой, анализ и интерпретация результатов исследования, статистическая обработка результатов, написание текста; *Т. И. Немировская* — корректировка текста статьи и окончательное утверждение версии статьи для публикации.

Authors' contributions. *Irina V. Kasina*—elaboration of the study idea, concept, and design, providing theoretical justification of the chosen quality control methods, determination of total spore concentration in live anthrax vaccine using the industry reference standard of bacterial suspension turbidity equivalent to 10 IU, summarising the experimental data, writing and revision of the text; *Svetlana A. Alekseeva*—performing the identification test for live anthrax vaccine, analysis, interpretation, and statistical processing of the study results, writing of the text; *Tatyana I. Nemirovskaya*—revision of the text, approval of the final version of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9). Выражаем благодарность главному технологу ИЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России кандидату биологических наук Фадейкиной

Ольге Васильевне за оказанную помощь в статистической обработке результатов.

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9). The authors express their gratitude to Olga Fadeykina, Candidate of Biological Sciences, chief technologist of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products for her assistance in statistical processing of the study results.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Шишкова НА, Герасимов ВН. Сибиреязвенные скотомогильники: проблемы и решения. М.: Династия; 2017. [Marinin LI, Dyatlov IA, Shishkova NA, Gerasimov VN. *Burial grounds of cattle that contain anthrax: problems and solution to them*. Moscow: Dynastiya; 2017 (In Russ.)]
2. Ковальчук НА. Сибиреязвенные скотомогильники: актуальные проблемы. *Известия Российской Военно-медицинской академии*. 2019;1(S1):214–6. [Kovalchuk NA. Siberian cattle burial grounds: actual problems. *Izvestiya Rossiyskoy Voенno-meditsinskoy akademii = Izvestia of the Russian Military Medical Academy*. 2019;1(S1):214–6 (In Russ.)]
3. Гаврилов ВА, Грязнева ТН, Селиверстов ВВ. Сибирская язва — вечная проблема землян. М.: ФГБОУ ВО МГБВМиБ — МВА им. К.И. Скрябина; 2017. [Gavrilov VA, Gryazneva TN, Seliverstov VV. *Anthrax — the eternal problem of earthlings*. Moscow: Moscow SAVMB; 2017 (In Russ.)]
4. Попова АЮ, Ежлова ЕБ, Демина ЮВ, Куличенко АН, Рязанова АГ, Буравцева НП и др. Пути совершенствования эпидемиологического надзора и контроля за сибирской язвой в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(1):84–8. [Popova AYU, Ezhlova EB, Demina YuV, Kulichenko AN, Ryazanova AG, Buravtseva NP, et al. Ways to improve the epidemiological surveillance and control of anthrax in the Russian Federation. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(1):84–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-1-84-88>
5. Ланцов ЕВ, Кобылкин ДВ, Кузин АА, Азаров ИИ, Аминов РМ. Роль и организация работы военных специалистов профилактического профиля при ликвидации последствий биолого-социальной чрезвычайной ситуации (на примере ликвидации очага сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г.). *Медицина катастроф*. 2017;(4):38–42. [Lantsov EV, Kobylkin DV, Kuzin AA, Azarov II, Aminev RM. Role and activity organization of military specialists of preventive measures line in liquidation of consequences of biological-social emergency situation (as exemplified by liquidation of anthrax focus in Yamalo-Nenets Autonomous okrug in 2016). *Meditsina katastrof = Disaster Medicine*. 2017;(4):38–42 (In Russ.)]
6. Супотницкий МВ. Биологическая война. Введение в эпидемиологию искусственных эпидемических процессов и биологических поражений. М.: Кафедра, Русская панорама; 2013. [Supotnitskiy MV. *Biological warfare. Introduction to the epidemiology of artificial epidemic processes and biological lesions*. Moscow: Kafedra, Russkaya panorama; 2013 (In Russ.)]
7. Шевцов АН, Коротышев ОВ, Пермяков СА, Погорельский ИП. Вакцинопрофилактика сибирской язвы в Российской Федерации и ее ближайшие перспективы. *Вестник войск РХБ защиты*. 2019;3(4):337–49. [Shevtsov AN,

- Korotyshev OV, Permyakov SA, Pogorelsky IP. Vaccinal prevention of anthrax in the Russian Federation and its immediate prospects. *Vestnik voysk RKhV zashchity = Journal of NBC Protection Corps*. 2019;3(4):337–49 (In Russ.)
8. Волова ЛЮ. Организация вакцинопрофилактики против сибирской язвы в плановом порядке и по эпидемическим показаниям на территории Ямало-Ненецкого автономного округа. *Журнал МедиАль*. 2018;2:36–8. [Volova LYu. Organization of vaccination against anthrax in a planned manner and for epidemic indications in Yamalo-Nenets Autonomous district. *Zhurnal MediAl = MediAl*. 2018;2:36–8 (In Russ.)]
 9. Саяпина ЛВ, Бондарев ВП, Олефир ЮВ. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;2:107–10. [Sayarina LV, Bondarev VP, Olefir YuV. Current state of the vaccine prophylaxis of particularly dangerous infections. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;2:107–10 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-107-110>
 10. Мовсесянц АА, Миронов АН, Меркулов ВА, Борисевич ИВ. Цели и задачи Испытательного центра экспертизы качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2012;1:7–9. [Movsesyants AA, Mironov AN, Merkulov VA, Borisevich IV. Aims and objectives of the Testing center for quality expertise of medical immunobiological preparations. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2012;1:7–9 (In Russ.)]
 11. Мовсесянц АА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;2:38–41. [Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Shimchuk LF. Quality standards of immunobiological medicinal products — new texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;2:38–41 (In Russ.)]
 12. Поздеев О.К. *Медицинская микробиология*. М.: ГЭОТАР-Мед; 2004. [Pozdeev OK. *Medical microbiology*. Moscow: GEOTAR-MED; 2004 (In Russ.)]
 13. Онищенко ГГ, Брагина ИВ, Ежлова ЕБ, Демина ЮВ, Пакскина НД, Шеенков НВ и др. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство*. М.: ЗАО «Шико», 2013. [Onishchenko GG, Bragina IV, Eglova EB, Demina YuV, Pakschina ND, Sheenkov NV, et al. *Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases. Practical guide*. Moscow: ZAO "Shiko"; 2013 (In Russ.)]
 14. Соловьев ПВ, Баранова ЕВ, Федюкина ГН. Разработка и опытно-экспериментальное производство иммунохроматографических тест-систем для выявления и идентификации *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* и *L. monocytogenes*. В кн.: *Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских учреждений Роспотребнадзора «Биологическая безопасность в современном мире»*. 21–22 апреля 2009 г. п. Оболensk. Протвино; 2009. С. 140–2. [Soloviev PV, Baranova EV, Fedyukina GN. Development and experimental production of immunochromatographic test systems for the detection and identification of *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* and *L. monocytogenes*. In: *Proceedings of the scientific and practical conference of young scientists and specialists of research institutions of Rosпотребнадзор «Biological safety in the modern world»*. April 21–22, 2009, Obolensk. Protvino; 2009. P. 140–2 (In Russ.)]
 15. Кравец ЕВ, Дугаржапова ЗФ, Родзиковский АВ, Хлынцева АЕ, Лулева НМ, Белова ЕВ и др. Применение методов латекс-агглютинации и иммунохроматографии для ускоренной идентификации культур *Bacillus anthracis* при эпидемиологических расследованиях вспышек. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011;1:81–2. [Kravets EV, Dugarzhapova ZF, Rodzиковский AV, Khlyntseva AE, Luneva NM, Belova EV, et al. Application of latex agglutination and immune chromatography methods for rapid identification of *Bacillus anthracis* cultures in the epidemiological investigation of outbreaks. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2011;1:81–2 (In Russ.)] [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-1\(107\)-81-82](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-1(107)-81-82)
 16. Егорова ИЮ, Селянинов ЮО, Ковалева ЕН. Оценка эффективности и практической пригодности современных методов экспресс-индикации возбудителя сибирской язвы. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016;2:3–13. [Egorova IY, Selyaninov YO, Kovaleva EN. Evaluation of effectiveness and feasibility of up-to-date methods for anthrax rapid indication. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016;2:3–13 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18551/rjoas.2016-02.01>
 17. Фадейкина ОВ, Касина ИВ, Алексеева СА, Ковтун ВП, Бурдина ЕН, Ермолаева ТН и др. Применение отраслевого стандартного образца мутности бактериальных взвесей для определения общей концентрации микробных клеток в суспензиях сибиреязвенного, чумного и бруцеллезного микробов. *Успехи современного естествознания*. 2015;(1–8):1287–90. [Fadeykina OV, Kasina IV, Alekseeva SA, Kovtun VP, Burdina EN, Ermolaeva TN, et al. Application of branch standard sample of bacterial suspension opacity for microbial cells total concentration determination in suspension of anthrax, plague and brucellosis bacteria. *Uspekhi sovremenogo estestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences*. 2015;(1–8):1287–90 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Касина Ирина Владимировна, канд. биол. наук. *Irina V. Kasina*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2002-0151>

Алексеева Светлана Александровна, канд. биол. наук. *Svetlana A. Alekseeva*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5804-5709>

Немировская Татьяна Ивановна, канд. мед. наук. *Tatyana I. Nemirovskaya*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0848-7306>

Поступила 22.07.2020
После доработки 06.11.2020
Принята к публикации 04.12.2020

Received 22 July 2020
Revised 6 November 2020
Accepted 4 December 2020