

Оценка иммунобиологических свойств вакцинных штаммов *Bordetella pertussis*

* И. А. Алексеева, О. В. Перельгина

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

Исследование, проведенное при оценке иммунобиологических свойств вакцинных коклюшных штаммов, дало возможность стандартизовать используемую для производства вакцины коклюшную бактериальную массу по содержанию поверхностных антигенов — агглютиногенов 1, 2 и 3; были установлены определенные уровни содержания агглютиногенов в посевных сериях, которые позволяют влиять на протективную активность коклюшной вакцины. Гетерогенность популяции штаммов бактерий была уменьшена за счет проведения селекции отдельных колоний по признаку экспрессии агглютиногенов. Посевные серии *B. pertussis*, полученные из вакцинных штаммов, подвергнутых селекции, были направлены на предприятия, производящие коклюшный компонент АКДС вакцины. Использование при производстве коклюшной вакцины более однородной бактериальной массы, активно экспрессирующей агглютиногены 1, 2, 3, позволило повысить показатели иммуногенной активности коклюшного компонента АКДС вакцины. Безопасность цельноклеточной коклюшной вакцины, изготовленной из посевной серии, прошедшей стандартизацию, не понизилась.

Ключевые слова: цельноклеточная коклюшная вакцина; коклюшный компонент АКДС вакцины; агглютиногены; селекция колоний *Bordetella pertussis*; протективная активность коклюшной вакцины

Для цитирования: Алексеева ИА, Перельгина ОВ. Оценка иммунобиологических свойств вакцинных штаммов *Bordetella pertussis*. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2018; 18(1): 57–64. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-57-64

* **Контактное лицо:** Алексеева Ирина Андреевна; Alekseeval@expmed.ru

Evaluation of Immunobiological Properties of *Bordetella pertussis* Vaccine Strains

* I. A. Alekseeva, O. V. Perelygina

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
8/2 Petrovsky boulevard, Moscow 127051, Russian Federation

The study performed as part of evaluation of immunobiological properties of *Bordetella pertussis* vaccine strains offered an opportunity to standardize pertussis bacterial mass based on the content of surface antigens — agglutinogens 1, 2 and 3. Certain levels of agglutinogens in seed lots were found to be capable of modifying the protective activity of pertussis vaccine. The heterogeneity of the bacterial strain population was reduced by applying selection criteria for colonies based on expression of agglutinogens. *B. pertussis* seed lots derived from vaccine strains that had undergone selection were sent to manufacturers of the pertussis component of DTP vaccine. Production of pertussis vaccine using a more homogenous bacterial mass that actively expresses agglutinogens 1, 2 and 3 made it possible to enhance immunogenic activity of the pertussis component of DTP vaccine. The safety of the whole-cell pertussis vaccine produced from the standardized seed lot was not compromised.

Key words: whole-cell pertussis vaccine; pertussis component of DTP vaccine; agglutinogens; selection of *Bordetella pertussis* colonies; protective activity of pertussis vaccine

For citation: Alekseeva IA, Perelygina OV. Evaluation of Immunobiological Properties of *Bordetella pertussis* Vaccine Strains. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2018; 18(1): 57–64. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-57-64

* **Contact person:** Alekseeva Irina Andreevna; Alekseeval@expmed.ru

В настоящее время коклюшная инфекция остается актуальной проблемой для здравоохранения всех стран мира. В основном этому заболеванию подвержены младенцы и дети младшего возраста. До введения в практику здравоохранения профилактических прививок коклюш занимал второе (редко — третье) место по заболеваемости и протекал чаще в острой форме, с осложнениями, характеризовался высокими показателями смертности [1].

В США до введения вакцинопрофилактики заболеваемость составляла 157 случаев на 100 тыс. населения. Активное применение с 1950 по 1975 г. цельноклеточной коклюшной вакцины (ЦКВ), входящей в состав АКДС (DTwP), позволило резко снизить заболеваемость до 1000–2000 случаев в год [2]. Подобная тенденция в 1960–1974 гг. была отмечена в Великобритании, Японии, ВНР, ЧССР, ГДР и других странах [1, 3].

В Российской Федерации в допрививочный период частота регистрации случаев коклюша составляла 390 и более на 100 тыс. населения. После начала широкого использования АКДС вакцины заболеваемость к концу 1970-х гг. составляла 5,8–10,8 на 100 тыс. населения [4].

Таким образом, использование в иммунопрофилактике комбинированной вакцины АКДС (DTwP), содержащей ЦКВ, способствовало резкому снижению числа случаев коклюша, реже стали регистрироваться тяжелые формы заболевания и летальные исходы [2, 3, 5, 6].

В то же время необходимо отметить страны (например, Франция, Канада, Италия, Швеция), использование в которых DTwP не привело к значительному снижению заболеваемости коклюшем, что впоследствии было объяснено использованием вакцин с низкой иммуногенной активностью [7–9].

Основываясь на понимании необходимости выпуска эффективных профилактических препаратов, ВОЗ разработала рекомендации, касающиеся качества (производства и выпуска серий), безопасности и активности ЦКВ, которые периодически обновляются [10].

Отечественная ЦКВ, входящая в состав АКДС вакцины, не всегда соответствовала требованиям ВОЗ. Так, в конце 1970-х и начале 1980-х гг. только половина выпущенных серий цельноклеточной коклюшной вакцины соответствовала принятому ВОЗ количественному показателю активности, определяемому с помощью протективного теста на мышах при интрацеребральном введении заражающей дозы бактерий [10]. Требуемая протективная активность к истечению срока годности сохранялась только у 79,9 % испытанных серий коклюшной вакцины [11, 12]. Сотрудники специализированной лаборатории ГИСК им. Л.А. Тарасевича, проведя большую исследовательскую работу, повысили качество ЦКВ до требуемых показателей. Большое внимание было уделено ростовым свойствам питательной среды и стандартности операций при ее изготовлении. Культуры *Bordetella pertussis*, полученные из штаммов, используемых для производства коклюшной вакцины (коклюшной суспензии), были оценены по гистаминсенсibilизирующей и лейкоцитозстимулирующей активностям; разработаны критерии по оценке указанных активностей; обоснована целесообразность использования в производстве коклюшной вакцины штаммов, обладающих средней токсичностью при высокой защитной активности [11].

Накопленные знания об изменчивости коклюшных бактерий, наблюдаемой как в условиях научной лаборатории, так и при производстве вакцины на предприятии, регистрируемые у циркулирующих штаммов *B. pertussis* клональные и серотиповые изменения по сравнению с вакцинными штаммами, недостаточная стандартность и стабильность коклюшного ком-

понента требуют его дальнейшего совершенствования [13–18]. В связи с этим целью работы являлось продолжение исследований по повышению качества цельноклеточной коклюшной вакцины (коклюшного компонента АКДС вакцины); задачей — изучение иммунобиологических свойств штаммов *B. pertussis* и использование выявленных закономерностей для повышения качества коклюшного компонента вакцины.

Материалы и методы

Вакцинные штаммы и посевные серии *Bordetella pertussis*.

Изучены иммунобиологические свойства шестнадцати вакцинных штаммов *B. pertussis*, которые использовались в разные годы и используются в настоящее время для производства ЦКВ, являющейся компонентом АКДС вакцины.

Штаммы 39, 298, 312, 345, 475 относятся к серотипу 1.2.3; штаммы 38, 187, 305 — к серотипу 1.2.0; штаммы 108, 160, 178, 262, 267, 429, 688, 703 — к серотипу 1.0.3; штамм 18323, используемый для заражения иммунизированных мышей, к серотипу 1.2.3.

Вакцинные штаммы были получены от детей, больных коклюшем, в начальный период широкого использования АКДС вакцин в нашей стране.

Изучение иммунобиологических свойств вакцинных штаммов и посевных серий проводили с использованием экспериментальных серий вакцин, изготовленных из каждого штамма специализированной лабораторией ГИСК им. Л.А. Тарасевича в соответствии с производственным регламентом (ПР) изготовления коклюшной вакцины № 136-69.

Стандартные образцы. Калибрование протективной активности цельноклеточной коклюшной вакцины проводили при использовании стандартного образца коклюшной вакцины ОСО 42-28-89 иммуногенности коклюшной вакцины (сер. 3). Калибрование ОСО 42-28-89 в международных единицах проводили в сравнении с международными стандартными образцами коклюшной вакцины выпуска 1980 г. (NIBSC code: 66/302; 66/303).

Сыворотки. Серотиповой состав популяции бактерий вакцинных штаммов изучали при использовании сывороток диагностических коклюшных к агглютиногенам 1, 2, 3 и паракклюшных к агглютиногену 14, адсорбированных для реакции агглютинации (РА) производства филиала «Медгамал» ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Питательные среды. В исследовании были использованы среды Борде-Жангу и казеиново-угольный агар (КУА) с 30 и 10 % крови человека соответственно. Среда были приготовлены в соответствии с прописями, приведенными в ПР изготовления коклюшной вакцины.

Животные. Вирулентность вакцинных штаммов *B. pertussis* исследовали на аутбредных мышах массой тела 12–14 г; дермoneкротическую активность — на белокожих кроликах породы шиншилла весом 1,5–2,0 кг. Протективную активность вакцинных штаммов, посевных серий и коклюшной вакцины — на инбредных (линии CBWA и F1 (C57Bl/6J×CBA)) и аутбредных мышах весом 10–12 г. Животные поступали из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Методы. Оценку вирулентных свойств бактерий проводили при интраназальном заражении мышей культурой *B. pertussis*; дермoneкротическую активность — при внутрикожном введении культуры кроликам; протективную активность — при интрацеребральном заражении иммунизированных мышей вирулентным штаммом 18323. Серотиповой состав популяции бактерий вакцинных штаммов *B. pertussis* определяли в реакции агглютинации (РА) с типоспецифическими сыворотками.

Для стандартизации условий проведения реакции при каждой постановке РА использовали референс-препарат — коклюшную вакцину. Используемые методы подробно изложены в МУК 4.2.2317-08 «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, коклюшных, паракоклюшных и бронхосептикозных бактерий».

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программы Excel.

Результаты и обсуждение

Коклюшная вакцина представляет собой убитые бактериальные клетки *B. pertussis*. Использование для производства вакцины штаммов с высокой протективной активностью и не-высокой токсичностью при соблюдении технологического процесса изготовления вакцины способно обеспечить высокую активность и специфическую безопасность препарата. В связи с этим особое внимание при изготовлении коклюшной вакцины должно уделяться штаммам.

Руководящие документы ВОЗ по изготовлению коклюшной вакцины указывают, что при производственном процессе бактерии *B. pertussis* не должны изменять или терять свои первоначальные свойства (морфологические, серологические, серотиповой состав, показатели специфической токсичности и протективной активности), установленные при характеристике используемого вакцинного штамма [10]. Кроме того, эксперты ВОЗ считают необходимым присутствие в вакцине поверхностных антигенов — агглютиногенов 1, 2, 3 (АГГ1, АГГ2, АГГ3), которые усиливают протективный эффект коклюшных

вакцин [10]. В документах ВОЗ, а также в научной литературе отсутствуют сведения о конкретных критериях количественного содержания агглютиногенов 1, 2, 3 в коклюшной вакцине, используя которые можно было бы влиять на протективную активность изготовленной вакцины.

Бактериальные клетки *B. pertussis* подвержены влиянию разнообразных факторов окружающей среды, результатом влияния является изменение исходных иммунобиологических свойств клетки, что создает трудности при их использовании в производстве вакцины [13, 19, 20]. Неизменность свойств клетки, которая должна лежать в основе производственного процесса изготовления вакцины, требует постоянного надзора и контроля за иммунобиологическим состоянием вакцинных штаммов.

В связи с этим при микробиологической работе с бактериальной культурой основной акцент был сделан на контроль за сохранением исходных свойств вакцинных штаммов в посевах серий.

Вакцинные штаммы были охарактеризованы по основным иммунобиологическим показателям (табл. 1). Представленные в таблице данные демонстрируют вариабельность иммунобиологических свойств бактерий *B. pertussis*, используемых в производстве коклюшной вакцины. Штаммы различаются между собой по серотиповому составу и способности экспрессировать АГГ1, АГГ2, АГГ3; в меньшей степени различия выражены в показателях дермoneкротической активности; отличия также проявлялись в вирулентности и протективной активности. Так, протективная активность вакцин с концентрацией 20 млрд кле-

Таблица 1. Иммунобиологические свойства вакцинных штаммов *B. pertussis*

Штамм	Протективная ак- тивность, МЕ/мл	Дермoneкротиче- ская активность, некроз/см	Вирулентность при интрана- зальном заражении, млн микр. кл.	Титр серотиповой сыворотки к агглютиногенам:		
				1	2	3
Выделены в 1950–1958 гг.						
187	3,5	1,1 × 1,0	35,4	320	80	—
262	9,4; 15,2	1,3 × 1,4 1,6 × 1,5	31,0–64,2	6400	—	3200
305	6,7	1,1 × 1,3	64,9	800	800	—
312	9,0; 16,4	1,5 × 1,0 1,3 × 1,8	70,0 35,3	3200 12 800	1600 3200	800 6400
345	12,2	1,4 × 1,6	34,6	3200	3200	160
Выделены в 1966–1971 гг.						
38	19,1	1,0 × 1,5	42,1	5120	2560	—
39	20,4	1,6 × 1,7	74,3	10 240	5120	5120
108	4,8	0,8 × 1,0	101,0; 47,1	1280	—	640
160	19,7	1,9 × 1,8	24,0	10 240	—	5120
178	14,9	1,1 × 1,1	30,8	10 240	—	5120
267	11,7	1,1 × 1,2	43,2	5120	—	2560
298	9,9; 23,1	1,2 × 1,7	83,1; 25,8	5120	5120	1280
429	21,8 10,3	1,6 × 1,6 1,1 × 1,6	24,0; 64,7	5120	—	10240
475	13,6	1,3 × 1,3	76,7	5120	640	1280
688	7,3	1,4 × 1,7	51,4	640	—	160
703	15,1	2,0 × 1,9	94,1; 53,8	5120	—	5120

Примечание. Знак (—) обозначает отсутствие агглютиногена в популяции бактерий данного штамма.

ток/мл, приготовленных из разных штаммов, колебалась от низких значений (3,5 международной единицы в мл (МЕ/мл)) до высоких (23,1 МЕ/мл) при существующем требовании ВОЗ не менее 8 МЕ/мл.

Приведенные результаты исследования (табл. 2) позволили предположить наличие взаимосвязи между уровнем содержания агглютиногенов 1, 2, 3 в посевной серии и протективной активностью: чем выше содержание агглютиногенов в клетках популяции бактерий штамма, тем большее значение имеет показатель протективной активности коклюшной вакцины, приготовленной из клеток данного штамма.

Посевные серии, в которых агглютиногены 1, 2, 3 в реакции агглютинации определялись типоспецифическими сыворотками в титре 200–800, проявляли невысокую протективную активность. Посевные серии, в которых агглютиногены 1, 2, 3 в реакции агглютинации определялись типоспецифическими сыворотками в титре 2560–10240, проявляли высокую протективную активность (≥ 10 МЕ/мл).

При использовании коэффициента парной ранговой корреляции Спирмена [21] установлена зависимость между зна-

чениями титров типоспецифических сывороток, отражающими содержание агглютиногенов 1, 2, 3 в коклюшной вакцине, и ее протективной активностью. Полученные значения коэффициента равнялись 0,80, 0,77 и 0,62 соответственно, что говорит о прямой высокой и умеренной (для последнего значения) взаимосвязи между сравниваемыми показателями.

Установлен нижний допустимый предел содержания АГГ1, АГГ2, АГГ3 в коклюшной вакцине. Так, при уровне агглютиногенов, выявляемых сывороткой в титре 1280, протективная активность вакцины обеспечивала 8 МЕ/мл — минимальное регламентированное требование, которое предъявляет ВОЗ к коклюшным вакцинам. Более высокое количественное содержание АГГ1, АГГ2, АГГ3, выявляемое типоспецифической сывороткой в титре 3200 и выше, демонстрирует более высокую протективную активность вакцины (≥ 10 МЕ/мл).

С целью выяснения причины различного содержания агглютиногенов в популяции бактерий разных штаммов и в коклюшных вакцинах была проведена оценка однородности популяции бактерий в лиофилизированной культуре *B. pertussis* разных партий высушивания. С этой целью лиофилизирован-

Таблица 2. Неоднородность популяции бактерий *B. pertussis* вакцинных штаммов

Штамм	Количество исследованных бактериальных образцов (колоний)	Агглютинация культур из отдельных бактериальных образцов типоспецифическими сыворотками к агглютиногенам:		
		1	2	3
39	12	9+++ 1++ 2+ 5120*	5+++ 4++ 2+; 1– 160*	10+ 2– —*
187	11	7+++ 1++ 3+ 3200	4+++ 3++ 1+ 3– 200	11– —
312	12	9+++ 2++ 1+ 5120	3+++ 3++ 4+; 2– 80	1++ 5+ 6– —
38	10	5+++ 4++ 1+ 1600	3+++ 4++ 2+; 1– 200	10– —
305	11	5+++ 3++ 2+; 1– 1600	4+++ 3++ 3+; 1– 400	3+++ 4++ 2+; 3– 200
345	12	7+++ 4++ 1+ 6400	5+++ 3++ 2+; 1– 1600	3+++ 1++ 4+; 3– 80
475	11	10+++ 1++ 10 240	6+++ 3++ 2+ 1280	5+++ 3++ 2+; 1– 640
267	10	10+++ 10 240	1– —	8+++ 2++ 2560
18323 тест-штамм	10	10+++ 10 240	9+++ 1++ 5120	7+++ 1++ 2+ 2560

Примечание. Знак (–) обозначает отсутствие агглютиногена в популяции бактерий данного штамма.

* Последняя строка в ячейках обозначает титр в реакции агглютинации для всей популяции бактерий штамма.

ную культуру регидратировали и высевали на чашки Петри с питательной средой так, чтобы получить изолированные колонии. Затем чашки Петри с засеянной культурой инкубировали при температуре $(36,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 3–4 суток. Выросшую культуру изучали под микроскопом-лупой.

Было установлено, что бактериальная биомасса после лиофильного высушивания представляла собой гетерогенную популяцию колоний, отличающихся по морфологическим признакам. Наряду с типичными для I фазы бактерий *B. pertussis* мелкими и полупрозрачными колониями имели место колонии среднего и крупного размера матового цвета.

Уровень агглютиногенов определяли в образцах бактериальной культуры, полученных из отобранных по морфологическим признакам отдельных типичных колоний. Из отобранных 10–12 колоний получали 10–12 бактериальных образцов. Для получения образца единичную колонию пересеивали на питательную среду, собирали выросшую культуру и полученную коклюшную суспензию исследовали в РА на содержание АГГ1, АГГ2, АГГ3. Было установлено, что клетки бактериальных образцов, полученные из разных колоний популяции бактерий одного штамма, содержали разный уровень агглютиногенов. Так, например, из 12 колоний штамма 39 культура девяти колоний агглютинировалась типоспецифической сывороткой к АГГ1 на 3+; культура одной колонии — на 2+; двух колоний — на +. Из тех же 12 колоний культура пяти колоний агглютинировалась типоспецифической сывороткой к АГГ2 на 3+; культура четырех колоний — на 2+; двух колоний — на +; одна колония не выявляла присутствие АГГ2. Из 12 колоний культура десяти колоний агглютинировалась типоспецифической сывороткой к АГГ3 на +; две колонии не выявляли присутствие АГГ3. Таким образом, разные колонии популяции бактерий одного штамма отличались по способности синтезировать поверхностные антигены — агглютиногены 1, 2, 3. В связи с этим титр, установленный в реакции агглютинации при использовании культуры из общей биомассы, а не отдельных колоний, представляет собой среднее значение с учетом наличия в популяции коклюшных бактерий, экспрессирующих агглютиногены с разной интенсивностью. Титр типоспецифической сыворотки к АГГ1 всей популяции бактерий штамма 39 составил 5120; к АГГ2 — 160; к АГГ3 — 0.

Возможно, способность бактериальных клеток синтезировать АГГ с разной степенью интенсивности обусловлена изменчивостью популяции бактерий *B. pertussis*, проявляющейся при использовании лабораторных питательных сред, или это последствия лиофильного высушивания культур. Полученные данные продемонстрировали, что при хранении лиофилизированные культуры *B. pertussis* по морфологии колоний в разной степени становятся гетерогенными: наблюдается диссоциация бактерий, которая проявляется увеличением числа колоний R-формы и уменьшением числа колоний S-формы; отмечается снижение уровня АГГ на поверхности клетки.

Ранее при производстве вакцины проводили отбор колоний *B. pertussis*, основываясь только на их морфологических признаках. Как следует из полученных результатов, данный подход не является оптимальным, так как он не отражает способность коклюшных бактерий синтезировать поверхностные антигены — агглютиногены.

Подтверждение неоднородности популяции бактерий штаммов и выявление прямой взаимосвязи между уровнем агглютиногенов в посевной серии и ее протективной активностью позволили усовершенствовать процесс подготовки посевных серий к лиофильному высушиванию.

Предложен новый метод приготовления посевных серий, основанный на микробиологической селекции колоний культуры по признаку экспрессии агглютиногенов. В соответствии с предложенным методом проводили отбор 10–15 колоний по морфологическому признаку, из отобранных колоний готовили бактериальные образцы и определяли в них в РА уровень АГГ1, АГГ2, АГГ3. Те образцы, которые продемонстрировали высокое содержание агглютиногенов (обычно из 10–15 колоний это 2–4 колонии), использовали для получения бактериальной массы, которую подвергали лиофильному высушиванию. В лиофильно высушенной посевной серии АГГ1, АГГ2, АГГ3 должны выявляться типоспецифическими сыворотками в титре не менее 1280. Если однократно проведенная селекция колоний не повышала уровень агглютиногенов 1, 2, 3 в популяции бактерий до требуемых показателей, то селекцию проводили повторно (табл. 3). С этой целью культуру, с которой уже была проведена селекция, высевали на питательную среду

Таблица 3. Титры типоспецифических сывороток к агглютиногенам 1, 2, 3, отражающие содержание агглютиногенов 1, 2, 3 в популяции бактерий вакцинных штаммов до и после проведения селекции колоний

Штамм, дата лиофилизации	Титр типоспецифической сыворотки к агглютиногенам			Штамм, дата лиофилизации	Титр типоспецифической сыворотки к агглютиногенам		
	1	2	3		1	2	3
До селекции				После селекции			
305 04.80	800	200	—	305 02.98	3200	800	—
305 02.98	3200	800	—	305 05.06	5120	1280	—
187 02.81	1600	400	—	187 06.97	3200	800	—
475 10.82	1600	200	800	475 05.97	3200	400	800
475 05.97	2560	320	640	475 01.04	5120	1280	10 240
267 10.1990	1280	—	1280	267 12.04	5120	—	10 240
703 03.98	800	—	800	703 03.08	10240	—	10 240

и вновь проводили отбор колоний по признаку интенсивности экспрессии агглютиногенов.

Селекция колоний *B. pertussis* по экспрессии агглютиногенов позволила провести стандартизацию культуры посевной серии, что повысило однородность популяции клеток *B. pertussis*. Приготовленная новым способом культура посевной серии обладает высокой протективной активностью. Начиная с 2000 г. на предприятия, производящие коклюшную вакцину, специализированная лаборатория ГИСК им. Л.А. Тарасевича стала направлять посевные серии *B. pertussis*, прошедшие селекцию по признаку количественного содержания агглютиногенов.

Использование на производстве посевных серий, прошедших селекцию и содержащих АГГ в количестве, выявляемом типоспецифической сывороткой в титре не менее чем 1280, позволило поднять показатели иммуногенной активности в коклюшной вакцине, изготовленной из данных посевных серий, о чем свидетельствуют данные, представленные в таблице 4. Из данных, представленных в таблице 4, видно, что в 2000 г., когда специализированная лаборатория ГИСК им. Л.А. Тарасевича только начала рассылать для изготовления ЦКВ посевные серии, прошедшие отбор, показатели протективной активности коклюшной вакцины были невысокими, лишь незначительно превышали минимально требуемую величину 8 МЕ/мл. Постепенно, по мере использования в производстве стандартизованных посевных серий, показатели активности стали расти и к 2008 г. достигли высоких значений. Это заключение относится как к показателям, полученным в ГИСК им. Л.А. Тарасевича (верхняя строка в ячейках таблицы), так и к результатам, полученным на предприятиях, производящих ЦКВ (нижняя строка в ячейках таблицы).

Высокая заболеваемость коклюшем в довакцинальную эру и ее значительное снижение после начала применения профилактических прививок убедительно доказывает значение иммунопрофилактики в защите восприимчивого населения от коклюша.

Используемые в разных странах для вакцинации детского населения цельноклеточные коклюшные вакцины отличаются по основным показателям: протективной активности и остаточной токсичности [22]. Это объясняется использованием разных технологий изготовления вакцины, разных штаммов, способом обезвреживания коклюшных бактерий, содержанием в дозе убитых клеток и др.

В связи с этим эффективность ЦКВ может колебаться в пределах от 46 до 92 % [23, 24]. В настоящее время отечественная ЦКВ по показателям качества соответствует требованиям ВОЗ и Европейской фармакопеи (ЕФ), но, учитывая значительную вариабельность иммунобиологических свойств *B. pertussis*, проблема, связанная с сохранением качества препарата и его усовершенствованием, всегда актуальна.

Микробиологическое исследование, проведенное в рамках усовершенствования порядка надзора за иммунобиологическими свойствами вакцинных коклюшных штаммов, дало возможность стандартизовать используемую коклюшную бактериальную массу по содержанию АГГ; были установлены конкретные уровни содержания агглютиногенов 1, 2 и 3 в посевных сериях, которые прогнозировали изготовление вакцины с регламентируемой активностью 8 МЕ/мл (выявляемые типоспецифическими сыворотками в титре не менее 1280) и высокой активностью (выявляемые типоспецифическими сыворотками в титре 3200 и выше).

Разработанный метод подготовки посевных серий *B. pertussis*, заключающийся в микробиологической селекции колоний по признаку экспрессии АГГ1, АГГ2, АГГ3, послужил основой для предложенного нового способа повышения иммуногенной активности коклюшных вакцин [25].

Помимо иммуногенной активности ведущим показателем качества коклюшной вакцины является ее безопасность. Эксперименты на животных показали, что безопасность ЦКВ, изготовленной из посевной серии, прошедшей стандартизацию по содержанию поверхностных протективных антигенов, не понизилась.

Таблица 4. Протективная активность коклюшных вакцин (МЕ/мл), изготовленных из посевных серий, прошедших селекцию по показателю содержания агглютиногенов 1, 2, 3

Штамм	2000 г.	2001 г.	2002 г.	2003 г.	2004 г.	2005 г.	2006 г.	2007 г.	2008 г.
703	9,2	8,9	7,5; 10,6	14,7	13,3	12,8	15,2	16,8	13,5
	8,3; 8,7	9,5; 9,9	10,1; 9,2	10,5	11,0	15,3	19,1	18,2	16,4
267	8,5	7,7; 12,8	11,2	16,6	14,3	13,8	15,1	8,0; 16,6	15,9; 13,8
	8,8; 9,0	8,8; 9,0	10,9; 9,8	11,2	12,9	10,8; 12,8	13,8	12,3; 10,1	—
38	9,2	10,0	5,8; 11,6	9,4; 12,3	11,6	14,3	10,2	15,2	14,2; 15,4
	8,4	10,8	13,7	11,6	14,2	14,9	13,8	16,1	—
305	8,1	11,0	10,1	9,9	9,1	15,3	13,4	12,8	14,9
	8,6; 8,9	9,4	10,2; 11,0	12,2	11,6	14,7	15,0	10,0; 9,4	13,2
312	10,1	9,7	8,3	12,3	13,0	14,8	13,7	15,2	15,9
	9,5	8,1; 9,8	10,1	14,6; 11,6	14,5	16,1	10,9	12,7	16,0
475	9,2	9,9	8,4	7,3; 21,9	10,1	15,5	13,9	14,0	12,8
	9,7	8,3; 10,8	14,8; 9,1	14,3	9,8; 11,5	12,1	11,8	15,1	13,8

Примечание. В числителе — данные ГИСК им. Л.А. Тарасевича; в знаменателе — данные предприятий, производящих АКДС вакцину (ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, филиалы ФГУП «НПО «Микроген» в городах Уфа и Пермь).

В настоящее время в мире для иммунопрофилактики коклюша используют комбинированные препараты, содержащие в своем составе цельноклеточную или бесклеточную коклюшную вакцину (БКВ). В США было проведено крупномасштабное когортное исследование, в котором установлено, что бесклеточная вакцина даже при пяти прививках не обеспечивает такой длительный и напряженный противокклюшный иммунитет, как одна доза цельноклеточного препарата [26]. На основании материалов различных испытаний и учитывая рост заболеваемости коклюшем в странах, где используют только БКВ, эксперты ВОЗ пришли к заключению, что широкое использование БКВ может привести к возврату коклюшной инфекции [23, 27, 28]. В этой ситуации ВОЗ рекомендует странам, в национальных программах которых предполагается использование ЦКВ, продолжать использовать эти вакцины для первичной вакцинации. При этом подчеркивается, что ЦКВ является практически безопасной (very safe) [28]. Противопоказаний к применению ЦКВ нет, кроме редких анафилактических реакций у детей на введение этих вакцин ранее.

Необходимо отметить, что в Российской Федерации разработаны два новых профилактических противокклюшных препарата. Один из них содержит природный комплекс антигенов, выделенный из клеток *B. pertussis* [29], другой представляет собой рекомбинантную живую коклюшную вакцину для интраназального применения [30]. В настоящее время препараты проходят доклинические и клинические исследования.

Считаем, что в России для предотвращения ситуации, связанной с ростом заболеваемости коклюшем и имеющей место в странах, использующих для иммунизации только бесклеточные коклюшные вакцины, необходимо проводить вакцинацию отечественными комбинированными препаратами, содержащими цельноклеточную вакцину. Для ревакцинации помимо цельноклеточной вакцины возможно, при необходимости, использование бесклеточных коклюшных препаратов.

Выводы

1. Показана возможность и целесообразность стандартизации посевных серий *B. pertussis*, используемых для производства коклюшного компонента АКДС вакцины, по содержанию поверхностных антигенов — агглютиногенов.

2. Установлены конкретные величины содержания агглютиногенов 1, 2 и 3 в посевных сериях, которые прогнозируют изготовление вакцины с регламентируемой активностью 8 МЕ/мл (выявляемые типоспецифическими сыворотками в титре не менее 1280) и высокой активностью (выявляемые типоспецифическими сыворотками в титре не менее 3200 и выше).

3. Использование при изготовлении коклюшных вакцин посевных серий со стандартизованным уровнем агглютиногенов 1, 2, 3 позволило повысить иммуногенную активность цельноклеточной вакцины (коклюшного компонента АКДС).

Информация об отсутствии конфликта интересов.

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

Литература / References

1. Захарова МС, Тамм ОМ, Воробьева АИ, Мартин ЯК, ред. Коклюш и паракоклюш в Эстонской ССР. Таллин: ВАЛГУС; 1983. [Zakharova MS, Tamm OM, Vorobieva AI, Myartin YaK, eds. Whooping Cough and Parapertussis in the Estonian SSR. Tallinn: VALGUS; 1983 (In Russ.)]
2. Clark T. Pertussis Epidemiology and Vaccination in the United States. 2012. Available from: https://www.hhs.gov/sites/default/files/nvpo/nvac/meetings/pastmeetings/2012/clark_and_messonnier_062512.pdf

3. Tondella ML, Carlone GM, Messonnier N, Quinn CP, Meade BD, Burns DL, et al. International Bordetella pertussis Assay Standardization and Harmonization Meeting Report. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States, 19–20 July 2007. Vaccine 2009; 27(6): 803–14.
4. Покровский ВИ, Онищенко ГГ, Черкасский БЛ. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке. М.: Медицина; 2003. [Pokrovsky VI, Onishchenko GG, Cherkasy BL. Evolution of Infectious Diseases in Russia in the 21st Century. Moscow: Medicine; 2003 (In Russ.)]
5. Захарова МС. Влияние вакцинации на мировое распространение коклюша. В кн.: Актуальные вопросы эпидемиологии коклюша. М.; 1977. С. 5–15. [Zakharova MS. The Effect of Vaccination on the Global Spread of Pertussis. In: Topical Issues of Epidemiology of Pertussis. Moscow; 1977. P. 5–15 (In Russ.)]
6. Чупринина РП, Алексеева ИА, Обухов ЮИ, Соловьев ЕА. Эффективность иммунопрофилактики коклюша комбинированными вакцинами, содержащими цельноклеточную или бесклеточную коклюшную вакцину. БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение 2014; (4): 4–13. [Chuprinina RP, Alekseeva IA, Obukhov Yul, Soloviev EA. The Effectiveness of Immunization Pertussis Combined Vaccines Containing Whole Cell Pertussis or Acellular Pertussis Vaccine. BIOpreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment 2014; (4): 4–13 (In Russ.)]
7. Guiso N, de La Rocque F, Njamkepo E, Lécuyer A, Levy C, Romain O. Pertussis Surveillance in Private Pediatric Practices, France, 2002–2006. Emerg Infect Dis. 2008; 14(7): 1159–61.
8. De Melker HE, Schellekens JFP, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rumke HC, Conyn-van Spaendonck MA. Reemergence of Pertussis in the Highly Vaccinated Population of the Netherlands: Observations on Surveillance Data. Emerg Infect Dis. 2000; 6: 348–57.
9. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HG, Gaastra W, Willems RJ. Polymorphism in the Bordetella pertussis Virulence Factors P.69/Pertactin and Pertussis Toxin in the Netherlands: Temporal Trends and Evidence for Vaccine-Driven Evolution. Infect Immun. 1998; 66: 670–5.
10. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series, No. 941. Annex 6. Recommendations for Whole-Cell Pertussis Vaccine. Geneva. World Health Organization. 2007; 301–32.
11. Чупринина РП. Система измерения и оценки качества коклюшного компонента в АКДС вакцине и проблемы стандартизации этого препарата: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Ростов-на-Дону; 1987. [Chuprinina RP. The Measurement and Assessment of the Quality of the Pertussis Component in the DTP Vaccine and the Problems of Standardization of This Drug. Dr. Med. Sci. [Thesis]. Rostov-on-Don; 1987 (In Russ.)]
12. Резепов ФФ, Чупринина РП, Чеботарева СВ, Кремлев ГИ. Препараты для иммунопрофилактики дифтерии, столбняка, коклюша и перспективы их совершенствования. В сб. тезисов Всесоюзной конференции «Стандартизация медицинских биологических препаратов для профилактики и диагностики инфекционных болезней». М.; 1979. С. 24–6. [Rezepov FF, Chuprinina RP, Chebotareva SV, Kremlev GUY. The Drugs for the Immunization of Diphtheria, Tetanus, Pertussis and Prospects for Their Improvement. In: Proc. of Abstracts All-Union Conference «Standardization of Medical Biological Preparations for the Prevention and Diagnosis of Infectious Diseases». Moscow; 1979. P. 24–6. (In Russ.)]
13. Лапаева ИА, Мебель СМ, Переверзев НА. Влияние некоторых факторов на изменчивость штаммов коклюшного микроба. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии 1981; (3): 53–8. [Lapaeva IA, Mebel SM, Pereverzev ON. The Influence of Some Factors on the Variability of Strains of Pertussis Microbe. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology 1981; (3): 53–8 (In Russ.)]
14. Idigbe EO, Parton K, Wardlaw AC. Rapidly of Antigenic Modulation of Bordetella pertussis in Modified Hornibrook Medium. J Med Microbiol. 1981; 14(4): 409–18.

15. Борисова ОЮ, Мазурова ИК, Ивашинникова ГА, Гадуа НТ, Рудакова ИА, Салова НЯ и др. Генетическая характеристика штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных от больных коклюшем в России. Медицинский альманах 2012; 2(21): 30–4. [Borisova OYu, Mazurova IK, Ivashinnikova HA, Gadua NT, Rudakova IA, Salova NYa, et al. Genetic Characterization of *Bordetella pertussis* Strains Isolated from Patients with Pertussis in Russia. Medical Almanac 2012; 2(21): 30–4 (In Russ.)]
16. Демина АА. Закономерности эпидемического процесса коклюша и паракоклюша в условиях массовой противокклюшной иммунопрофилактики и характеристика циркулирующих возбудителей: дис. ... д-ра мед. наук. М.; 1970. [Demina AA. The Regularities of the Epidemic Process of Pertussis and Parapertussis in Terms of Mass Pertussis Immunization and Characterization of Circulating Pathogens. Dr. Med. Sci. Moscow; 1970 (In Russ.)]
17. Курова НН, Ценева ГЯ, Васильева ВИ, Зверькина НН, Лямина ВП, Лосева ЛВ, Чупрынина РП. Молекулярное типирование штаммов *Bordetella pertussis*, циркулировавших в Санкт-Петербурге в период подъема заболеваемости. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 2006; (4): 13–5. [Kurova NN, Zeneva TN, Vasilieva VI, Zvarykina NN, Lyamina VP, Loseva LV, Chuprynnina RP. Molecular Typing of *Bordetella pertussis* Strains Circulating in Saint-Petersburg in the Period of Increasing Incidence. Molecular genetics, Microbiology and Virology 2006; (4): 13–5 (In Russ.)]
18. Мазурова ИК, Борисова ОЮ, Комбарова СЮ, Гадуа НТ, Алешкин ВА. Динамика изменчивости основных генов патогенности штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных от больных коклюшем в Москве (1948–2005 гг.). Молекулярная медицина 2008; (1): 40–5. [Mazurova IK, Borisova OYu, Kombarova SYu, Gadoua NT, Aleshkin VA. The Variability of Major Pathogenicity Genes of *Bordetella pertussis* Strains Isolated from Patients with Pertussis in Moscow (1948–2005). Molecular medicine 2008; (1): 40–5 (In Russ.)]
19. Kourova N, Caro V, Weber CH, Thiberge S, Chuprinina R. Comparison of the *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* Isolates Circulating in Saint Petersburg between 1998 and 2000 with Russian Strains. J Clin Microbiol. 2003; 41(8): 3706–11.
20. Borisova O, Kombarova SYu, Zakharova NS, van Gent M, Aleshkin VA, Mazurova IK, Mooi FR. Antigenic Divergence between *Bordetella pertussis* Clinical Isolates from Moscow, Russia, and Vaccine Strains. Clin Vaccine Immunol. 2007; 14(3): 234–8.
21. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена. [The Spearman rank correlation coefficient (In Russ.)] Available from: www.infamed.com/stat/s05.html
22. Захарова МС. Проблемы специфической профилактики коклюша. В кн.: Специфическая профилактика коклюша. М.: Медгиз; 1958. С. 3–19. [Zakharova MS. Problem of Specific Prophylaxis of Whooping Cough. In: Specific Prophylaxis of Whooping Cough. Moscow: Medgiz; 1958. P. 3–19 (In Russ.)]
23. Pertussis Vaccines: WHO Position Paper — August 2015. World Health Organization. Weekly Epidemiological Record 2015; 90(35): 433–460. Available from: <http://www.who.int/wer/2015/wer9035.pdf?ua=1>
24. Pertussis vaccines: World Health Organization. Weekly epidemiological record 2010; 85(40): 385–400. Available from: <http://www.who.int/wer/2010/wer8540.pdf>
25. Чупрынина РП, Алексеева ИА. Способ получения коклюшного компонента комбинированных вакцин. Бюллетень «Изобретения. Полезные модели» 2015; № 3 (27.01.15). Патент № 2540014. [Chuprinina RP, Alekseeva IA. The Method of Obtaining the Pertussis Component of Combined Vaccines. The Bulletin «Inventions. Utility model» 2015; No. 3 (27.01.15). Patent No. 2540014 (In Russ.)]
26. Witt MA, Arias L, Katz PH, Truong ET, Witt DJ. Reduced Risk of Pertussis among Persons ever Vaccinated with Whole Cell Pertussis Vaccine Compared to Recipients of Acellular Pertussis Vaccines in a Large US Cohort. Clin Infect Dis. 2013; 56: 1248–54.
27. Revised Guidance on the Choice of Pertussis Vaccines. World Health Organization. Weekly Epidemiological Record 2014; 89(30): 337–44. Available from: <http://www.who.int/wer/2013/wer8930.pdf?ua=1>
28. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization, April 2014 — Conclusions and Recommendations. World Health Organization. Weekly epidemiological record 2014; 89(21): 221–36. Available from: <http://www.who.int/wer/2014/wer8921.pdf?ua=1>
29. Николаева АМ, Языкова МН, Калашникова ЕА, Иванов АВ, Сперанская ВН. Изучение безопасности и антигенной структуры новой бесклеточной коклюшной вакцины. Российский иммунологический журнал 2014; 8(3): 914–6. [Nikolaeva AM, Yazykova MN, Kalashnikova EA, Ivanov AV, Speranskaya VN. The Study of the Safety and Antigenic Structure of the New Acellular Pertussis Vaccine. Russian Journal of Immunology 2014; 8(3): 914–6 (In Russ.)]
30. Синяшина ЛН. Молекулярно-генетическая модификация бактерий рода *Bordetella* для создания рекомбинантных препаратов для профилактики коклюша: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2017. [Sinyashina LN. Molecular Genetic Modification of Bacteria of the Genus *Bordetella* For Creation of Recombinant Drugs for the Prevention of Pertussis. Dr. Med. Sci. [Thesis]. Moscow; 2017 (In Russ.)]

Об авторах

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

Алексеева Ирина Андреевна. Главный эксперт лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук

Перельгина Ольга Викторовна. Начальник лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2 Petrovsky boulevard, Moscow 127051, Russian Federation

Irina A. Alekseeva. Chief Expert of the Laboratory of Toxoids and Antitoxic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Medical Sciences

Olga V. Perelygina. Head of the Laboratory of Toxoids and Antitoxic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences

Поступила 09.10.2017

Принята к публикации 08.02.2018

Received 9 October 2017

Accepted 8 February 2018