

Оценка возможности применения иммунохроматографического метода для экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена туляремийного (Тулярина) по показателю «Подлинность»

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

✉ Касина Ирина Владимировна; kasina@expmed.ru

Резюме

Определение показателя качества «Подлинность», согласно требованиям нормативной документации на вакцину чумную живую и аллерген туляремийный жидкий (Тулярин), проводится иммунофлуоресцентным методом, однако серьезным недостатком метода является его трудоемкость. Альтернативным методом испытания данных препаратов является иммунохроматографический (ИХ) метод, обладающий рядом преимуществ, в том числе высокой скоростью проведения испытания и простотой учета результатов.

Цель работы: оценка возможности применения иммунохроматографического метода для экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена туляремийного (Тулярина) по показателю «Подлинность».

Материалы и методы: испытание показателя качества «Подлинность» проводили на образцах фармакопейного стандартного образца вакцины чумной живой и трех коммерческих серий вакцины; аллергена туляремийного жидкого (Тулярин) двух серий. Исследование показателя качества «Подлинность» препаратов ИХ методом проводили с помощью следующих наборов реагентов: ИХ тест-система для экспресс-выявления и идентификации микробных клеток *Yersinia pestis* «ИХ тест-система *Y. pestis*» и ИХ тест-система для экспресс-выявления и идентификации *Francisella tularensis* «ИХ тест-система *F. tularensis*» производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Результаты: показано, что ИХ метод является эффективным экспресс-методом для видоспецифического подтверждения наличия *Y. pestis* в вакцине чумной живой и *F. tularensis* в аллергене туляремийном жидком (Тулярин). Установлена рекомендуемая концентрация вакцины чумной живой для проведения испытания по показателю «Подлинность» ИХ методом – 10^9 м.к./мл. Испытание аллергена туляремийного жидкого (Тулярина) по показателю «Подлинность» ИХ методом рекомендовано проводить с использованием цельного препарата.

Выводы: полученные результаты могут служить основанием для внесения ИХ метода с использованием указанных наборов реагентов в нормативную документацию на вакцину чумную живую и на аллерген туляремийный жидкий (Тулярин) в качестве альтернативного метода определения показателя «Подлинность».

Ключевые слова: вакцина чумная живая; *Yersinia pestis*; аллерген туляремийный жидкий (Тулярин); *Francisella tularensis*; подлинность; иммунохроматографический метод; иммунохроматографическая тест-система; фармакопейный стандартный образец мутности бактериальных взвесей 10 МЕ; нормативная документация

Для цитирования: Касина И.В., Алексеева С.А., Немировская Т.И. Оценка возможности применения иммунохроматографического метода для экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена тулярийного (Тулярина) по показателю «Подлинность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):231–240. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-231-240>

Evaluation of the applicability of immunochromatography to the identification of live plague vaccines and the tularaemia allergen (Tularin)

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

✉ Irina V. Kasina; kasina@expmed.ru

Abstract

The regulatory standards require that the identification of live plague vaccines and the liquid tularaemia allergen (Tularin) should be performed by immunofluorescence. A major drawback of the recommended method is its labour intensive nature. However, immunochromatography represents an alternative method that offers a number of advantages, including rapid testing and easy result interpretation.

The aim of the study was to assess the applicability of immunochromatography to the identification of live plague vaccines and the liquid tularaemia allergen (Tularin).

Materials and methods. The authors performed identification tests using samples of the pharmacopoeia standard for live plague vaccines, three commercial batches of a live plague vaccine, and two batches of the liquid tularaemia allergen (Tularin). These samples were tested using immunochromatographic assay (ICA) reagent kits for rapid detection and identification of *Yersinia pestis* (ICA System for *Y. pestis*) and *Francisella tularensis* (ICA System for *F. tularensis*) manufactured by the State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology.

Results. The findings show that immunochromatography is an effective, rapid, and species-specific method to confirm the presence of *Y. pestis* in a sample of a live plague vaccine or *F. tularensis* in a sample of the liquid tularaemia allergen (Tularin). To perform identification tests by immunochromatography, the authors recommend diluting live plague vaccine samples to a concentration of 10^9 bacterial cells/mL and using undiluted samples of the liquid tularaemia allergen (Tularin).

Conclusions. The study results may support the inclusion of ICA into the regulatory standards for live plague vaccines and the liquid tularaemia allergen (Tularin) as an alternative identification method.

Key words: live plague vaccine; *Yersinia pestis*; liquid tularaemia allergen (Tularin); *Francisella tularensis*; identification; immunochromatographic method, immunochromatographic test system; 10 IU pharmacopoeia standard for bacterial suspension turbidity; regulatory standards

For citation: Kasina I.V., Alekseeva S.A., Nemirovskaya T.I. Evaluation of the applicability of immunochromatography to the identification of live plague vaccines and the tularaemia allergen (Tularin). *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):231–240. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-231-240>

Введение

В соответствии с общей фармакопейной статьей (ОФС) – ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты¹ подлинность лекарственного препарата определяется с помощью различных лабораторных методов, позволяющих специфически его идентифицировать. Определение показателя качества «Подлинность», согласно требованиям нормативной документации (НД) на вакцину чумную живую² и аллерген туляремийный жидкий (Тулярин)³, проводится иммунофлуоресцентным методом. Результаты контроля оценивают при микроскопии мазков из препарата, окрашенных специфическими флуоресцирующими иммуноглобулинами. В качестве недостатков метода иммунофлуоресценции следует отметить его трудоемкость, обусловленную необходимостью проведения довольно длительной пробоподготовки, и наличие специального дорогостоящего оборудования. Кроме того, процедура проведения экспертизы качества чумной вакцины по показателю «Подлинность» становится зависимой от наличия диагностических чумных флуоресцирующих иммуноглобулинов, выпускаемых единственным производителем – ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

В целях поиска альтернативных методов испытания вакцины чумной живой и аллергена туляремийного жидкого по показателю «Подлинность» нами был проведен анализ существующих методов определения этого показателя и возможностей выпускаемых зарегистрированных диагностических препаратов и тест-систем [1]. Предпочтение имели методы для ускоренной идентификации чумного и туляремийного микробов в течение одного рабочего дня. Выбор авторов статьи был сделан в пользу иммунохроматографического (ИХ) метода. Принцип действия данного метода, как и иммунофлуоресценции, основан на реакции образования иммунного комплекса «антиген-антитело». При этом на мембранные компоненты тест-полоски предварительно нанесены реагенты, и при контакте с пробой происходит движение жидкости по мембранам с образованием специфических иммунных комплексов, которые благодаря включению окрашенного маркера могут детектироваться визуально [2].

Достоинствами выбранного метода являются высокая скорость проведения испытания (10–15 мин), малые объемы испытуемого образца, простота учета и интерпретации результата, а также высокая чувствительность и воспроизводимость. Достоверность результатов тестирования достигает 92–99,8%, при этом каждый тест имеет встроенный внутренний контроль. Данный метод подходит для количественного определения, обладает возможностью использования при помощи портативных ридеров, совместимых с компьютером, и возможностью мультианализа результатов иммунохроматографии, что обусловило активное применение метода иммунохроматографического анализа (ИХА) для решения разнообразных диагностических задач [2].

Метод ИХА используется в различных областях народного хозяйства и медицины, успешно применяется в лабораторной диагностике особо опасных инфекционных заболеваний, в том числе для выявления чумного и туляремийного микробов [3, 4].

В зарубежной научной литературе имеются данные о разработке и тестировании экспресс-диагностического ИХ-теста на наличие возбудителя бубонной и легочной форм чумы [5]. Установлено, что при применении ИХ-теста для ускоренной идентификации чумного микроба при исследовании клинического материала аналитическая чувствительность набора реагентов составила 0,5 нг/мл F1-антигена, время проведения анализа – не более 15 мин.

В отечественной литературе также описаны результаты апробации российской ИХ тест-системы производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) для индикации капсульного антигена чумного микроба в полевых изолятах *Y. pestis* и в суспензиях органов мелких млекопитающих. Показана высокая информативность ИХ-теста, достоверность полученных результатов, и доказано, что данный диагностический препарат может быть использован для экспресс-индикации антигена фракции 1 (F1) чумного микроба непосредственно при вскрытии животных, в том числе при проведении диагностических исследований не только в очагах чумы, но и в работе мобильного ком-

¹ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

² Фармакопейная статья 3.3.1.0022.15 Вакцина чумная живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ Фармакопейная статья 3.3.1.0068.18 Аллерген туляремийный жидкий (Тулярин). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

плекса санитарной противоэпидемической бригады [6–8].

В Российской Федерации ведутся научные разработки иммуноферментных и иммунохроматографических моноклональных тест-систем для выявления возбудителя туляремии [9, 10]. В настоящее время зарегистрирован диагностический препарат – набор реагентов ИХ тест-система для экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии «ИХ тест-система *F. tularensis*» производства ФБУН ГНЦ ПМБ. Имеется описание применения данной тест-системы для экспресс-выявления антигена *F. tularensis* при мониторинге природных очагов туляремии. В работе А.А. Зайцева с соавт. [11, 12] показано, что с учетом методической простоты постановки реакций для экспресс-выявления липополисахарида (ЛПС) – антигена возбудителя туляремии и возможности быстрого получения результата (15–20 мин) ИХ-тест может быть рекомендован для изучения проб, в которых возможно присутствие антигена в заведомо большой концентрации. К таким пробам относятся взвеси из штаммов возбудителя туляремии, выделяемых на территории природных очагов, суспензии внутренних органов павших биопробных животных и суспензии пулов иксодовых клещей [11, 12].

Ранее авторами данной статьи были представлены результаты успешного применения ИХ-тестов в испытании вакцины туляремийной живой и вакцины сибиреязвенной живой по показателю качества «Подлинность» [13, 14].

Цель работы – оценка возможности применения иммунохроматографического метода для экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена туляремийного (Тулярина) по показателю «Подлинность».

Материалы и методы

Материалы:

- вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, серии 3-18, 1-21, 2-21;
- фармакопейный стандартный образец (ФСО) вакцины чумной живой – ФСО 3.2.00392 (отраслевой стандартный образец

(ОСО) 42-28-392) серий 10 и 11 производства ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России;

- аллерген туляремийный жидкий (Тулярин), суспензия для накожного скарификационного нанесения 20 доз/мл производства АО «НПО «Микроген», серии О9 и О0121;
 - ФСО мутности бактериальных взвесей – ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) (10 МЕ) производства ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (далее – ФСО мутности);
 - иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей производства ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора по ТУ 21.20.21-46-01897080-2017 (регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8209 от 15.03.2019), серия 122, срок годности 2 года;
 - иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие («РИФ-Тул-СтавНИПЧИ») производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора по ТУ 8961-016-01898109-2007 (регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00881 от 15.03.2013, по ГОСТ Р 7.0.12-2011), серия С 3-19, срок годности 3 года;
 - набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации возбудителя чумы «ИХ тест-система *Y. pestis*» производства ФБУН ГНЦ ПМБ по ТУ 9398-091-78095326-2008 (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05487), серии 11 и 18, срок годности 1 год;
 - набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии «ИХ тест-система *F. tularensis*» производства ФБУН ГНЦ ПМБ по ТУ 9398-092-78095326-2008 (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05486), серии 11 и 18, срок годности 1 год.
- Все препараты использованы в течение срока их годности.

Методы

В соответствии с НД⁴ испытание по показателю «Подлинность» вакцины чумной живой и аллергена туляремийного проводили иммунофлуоресцентным методом. Для приготовления мазка вакцину чумную живую разводили 0,9% раствором натрия хлорида до концентрации 5×10^8 м.к./мл. Мазок из аллергена туляремийного

⁴ Нормативная документация. ЛСР-005759/08-231120, Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций.

Нормативная документация. ЛСР-009941/08-220921, Аллерген туляремийный жидкий (Тулярин), суспензия для накожного скарификационного нанесения.

готовили из цельного препарата. Далее мазки окрашивали соответствующими иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими согласно инструкции по применению. В мазках микробные клетки должны иметь яркое зеленовато-желтое свечение по периферии. Учет результатов проводили по четырехкрестовой системе: 4 креста – сверкающая флуоресценция желтовато-зеленого цвета оболочки микробной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки; 3 креста – яркая флуоресценция желтовато-зеленого цвета оболочки микробной клетки; 2 креста и 1 крест – слабое свечение всей клетки. Положительным результатом считали свечение на 3 и 4 креста.

Для постановки ИХ реакций использовали зарегистрированные коммерческие препараты. ИХ-тест (иммунохроматографическая полоска) состоит из следующих основных элементов: пластиковая подложка, на которую наклеены все остальные компоненты теста; фильтр (прокладки для образца); прокладка или мембрана с конъюгатом; хроматографическая мембрана, содержащая одну или несколько зон захвата иммунных комплексов и контрольную зону захвата; мембрана абсорбции (впитывающая прокладка).

В соответствии с инструкцией по применению набор реагентов «ИХ тест-система *Y. pestis*» предназначен для экспресс-выявления и идентификации микробных клеток *Y. pestis* при проведении лабораторных исследований объектов окружающей среды. «ИХ тест-система *Y. pestis*» обеспечивает видоспецифическое выявление и идентификацию микробных клеток *Y. pestis* в концентрации 10^7 м.к./мл и капсульного антигена F1 *Y. pestis* в концентрации 0,01 мг/мл в суспензиях, полученных из колоний микроорганизмов, выращенных на питательном агаре, и в суспензиях, полученных из объектов внешней среды путем специальной пробоподготовки. Тест-система не выявляет микробные клетки бескапсульных штаммов *Y. pestis*.

В проведенном испытании использованы коммерческие серии и серии ФСО вакцины чумной живой. Вакцина представляла собой лиофилизированные в стабилизирующей среде микробные клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EB линии НИИЭГ, который имеет капсульный антиген F1. Ампулу с вакциной восстанавливали в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида, довели до концентрации микробных клеток по ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, соответствующей 10^9 м.к./мл для чумного микроба, и инактивировали при температуре 56 °С в течение 30 мин. Дополнительно полученный образец разводили в 0,01 М натрий-фосфатном

буферном растворе (рН 7,4) до концентраций 10^8 м.к./мл и 10^7 м.к./мл. Далее постановку теста и учет результатов осуществляли в соответствии с инструкцией по применению набора «ИХ тест-система *Y. pestis*».

Набор реагентов «ИХ тест-система *F. tularensis*» предназначен для экспресс-выявления и идентификации микробных клеток *F. tularensis* в микробных взвесах с концентрацией 10^7 м.к./мл, полученных из колоний микроорганизмов или из объектов внешней среды путем специальной пробоподготовки (культивирование и инактивирование микроорганизма). Специфической мишенью, наличие которой в пробе выявляет данный тест, является ЛПС *F. tularensis*.

Аллерген туляремийный жидкий (Тулярин) представляет собой инактивированную нагреванием суспензию культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации $(9,5 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл. Инактивирование и дополнительная пробоподготовка препарата для испытания не требуются. В исследовании использовали пробы неразведенного препарата и разведенного в буферном растворе до концентрации 5×10^9 м.к./мл, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ. Постановку теста и учет результатов осуществляли согласно инструкции по применению: извлекали тест-систему из холодильника, выдерживали 15 мин при комнатной температуре, извлекали из упаковки, помещали в чашку Петри, с помощью дозатора наносили в приемное окно тест-системы подготовленные пробы вакцины или аллергена в объеме 0,1 мл и после 3 мин экспозиции в него же дополнительно вносили 0,1 мл фосфатно-буферного раствора (ФБР). Буферный раствор готовили *ex tempore*, стерилизация раствора не требуется. Через 15–20 мин получали результат, который определяется визуально. Положительным результатом на присутствие туляремийного микроба в «ИХ тест-системе *F. tularensis*» и на присутствие капсульного антигена чумного микроба в «ИХ тест-системе *Y. pestis*» является наличие видимых 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 задачи исследования не входило изучение специфичности наборов «ИХ тест-система *Y. pestis*» и «ИХ тест-система *F. tularensis*», так как они являются зарегистрированными коммерческими препаратами с заявленной чувствительностью и специфичностью,

контрольной пробой служили не образцы других вакцин против особо опасных инфекционных заболеваний, а 0,01 М натрий-фосфатный буферный раствор, которым разводили образцы вакцины чумной и Тулярина.

Результаты и обсуждение

Результаты испытания вакцины чумной и аллергена туляремийного по показателю «Подлинность» иммунофлуоресцентным методом в соответствии с действующей НД представлены на *рисунках 1 и 2*. *Y. pestis* – овоидная грамотрицательная палочка размером 1–2×0,3–0,7 мкм, окрашивается биполярно [15]. Чумной микроб крупнее туляремийного в 5 раз. На фотографии (*рис. 1*) отчетливо видно специфическое свечение оболочки микробной клетки, что соответствует оценке в 4 и 3 креста, и темное тело клетки. Туляремийный микроб представляет собой грамотрицательные очень мелкие (0,1–0,5 мкм) неподвижные полиморфные кокковидные палочки [15]. Соответственно, при увеличении в 1000 раз микробные клетки светятся целыми конгломератами, что затрудняет учет результатов (*рис. 2*). Указанные выше недостатки и возможные трудности при проведении иммунофлуоресценции являются ограничением использования данного метода.

Далее были проведены испытания качества вакцины чумной живой по показателю «Подлинность» с использованием диагностического препарата «ИХ тест-система *Y. pestis*». Специфической мишенью ИХ-теста является капсульный антиген, который синтезируется плазмидой

pFra вакцинного штамма *Y. pestis* EB, входящего в состав вакцины чумной живой.

В первом испытании с целью выбора нужной концентрации чумного микроба для определения показателя «Подлинность» использовали препарат вакцины чумной живой коммерческой серии 3-18 и ФСО вакцины чумной живой серии 10 в концентрации 10^9 , 10^8 , 10^7 м.к./мл. Полученные результаты (*рис. 3*) продемонстрировали наличие реакции связывания антигена со специфическими антителами в обеих сериях вакцины в концентрациях 10^9 и 10^8 м.к./мл. В тестовой зоне видно наличие полос красного цвета. Заявленная чувствительность тест системы – 10^7 м.к./мл, но в данной концентрации реакция ИХ-теста была отрицательная (*рис. 3А и 3В*). Возможно, это объясняется тем, что некоторые компоненты вакцины ингибируют процесс выявления *Y. pestis* в заявленной концентрации. Цель наших исследований состояла не в индикации возбудителя чумы, а в подтверждении подлинности вакцины чумной живой, что равнозначно при использовании иммунофлуоресцентного метода в соответствии с действующей НД. Чувствительность иммунофлуоресцентного метода для индикации возбудителя чумы – 5×10^5 м.к./мл, а рекомендуемая концентрация вакцины для приготовления мазков при испытании по показателю «Подлинность» – 5×10^8 м.к./мл. Таким образом, в соответствии с полученными результатами заявленная чувствительность тест-системы позволяет использовать ИХ-тест для подтверждения подлинности вакцины чумной живой в соответствии с действующей НД. Исходя из того что в 1 мл

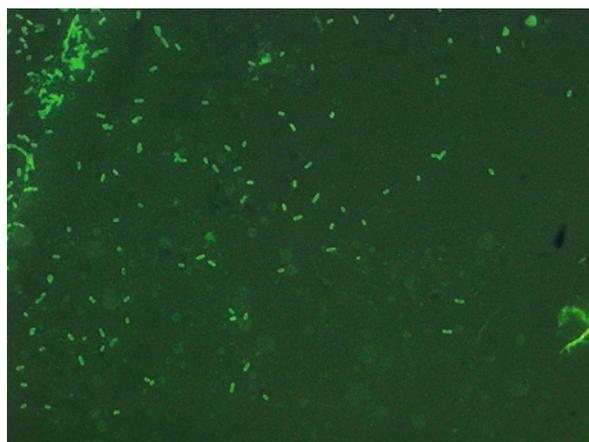


Рис. 1. Результаты испытаний вакцины чумной живой по показателю «Подлинность» с помощью препарата иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих чумных адсорбированных лошадиных. Микроскопия, увеличение ×1000.

Fig. 1. Results of live plague vaccine identification using diagnostic adsorbed fluorescent equine plague immunoglobulins. Microscopy, ×1000 magnification.

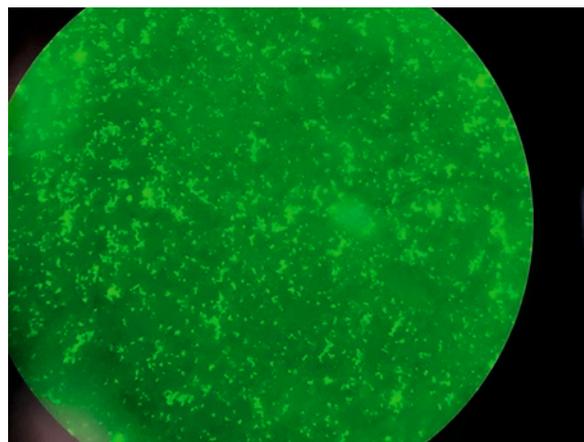


Рис. 2. Результаты испытаний аллергена туляремийного (Тулярина) по показателю «Подлинность» с помощью препарата иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляремийных адсорбированных. Микроскопия, увеличение ×1000.

Fig. 2. Results of tularaemia allergen (Tularin) identification using diagnostic adsorbed fluorescent tularaemia immunoglobulins. Microscopy, ×1000 magnification.

вакцины содержится от 50 до 100 млрд микробных клеток чумного микроба, для проведения испытания по показателю «Подлинность» дополнительной пробоподготовки вакцины не требуется и проведение испытания занимает минимальное время.

Далее, для подтверждения выбранной концентрации 10^9 м.к./мл вакцины чумной для испытания по показателю «Подлинность» с помощью набора реагентов «ИХ тест-система *Y. pestis*» нами были проведены дополнительные исследования вакцины чумной живой других коммерческих серий (1-21; 2-21) и ФСО вакцины чумной живой серии 11. При испытании вакцины в концентрации 10^9 м.к./мл, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, отчетливо видны полосы красного цвета как в зоне «С» (контрольная зона), так и в зоне «Т» (тестовая зона) (рис. 3С). Учитывая, что реакция качественная, разница в интенсивности окраски полос не имеет значения.

Таким образом, на основании полученных результатов для проведения испытания вакцины чумной по показателю «Подлинность» ИХ методом рекомендуется образец вакцины разводить до концентрации 10^9 м.к./мл, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ.

Следует отметить, что для сокращения времени контроля данное испытание возможно проводить параллельно с определением общей концентрации микробных клеток в вакцине, при котором применяется ФСО мутности 10 МЕ.

В ходе проведения исследования нами впервые был применен диагностический препарат «ИХ тест-система *F. tularensis*» для оценки качества аллергена туляремийного жидкого (Тулярина) по показателю «Подлинность». При испытании Тулярина с помощью набора реагентов «ИХ тест-система *F. tularensis*» использовали образцы коммерческих серий О9 и О0121 неразведенного (цельного) препарата (концентрация $1,0 \times 10^{10}$ м.к./мл) и разведенного до концентрации, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (концентрация 5×10^9 м.к./мл). Постановку опыта с неразведенным препаратом проводили на разных образцах серии О0121 два оператора. Результаты испытания двух серий аллергена представлены на рисунке 4. Показано, что при испытании всех образцов отчетливо выявлены полосы красного цвета как в зоне «С» (контрольная зона), так и в «Т» (тестовая зона). При этом полосы по интенсивности практически не отличаются друг от друга.

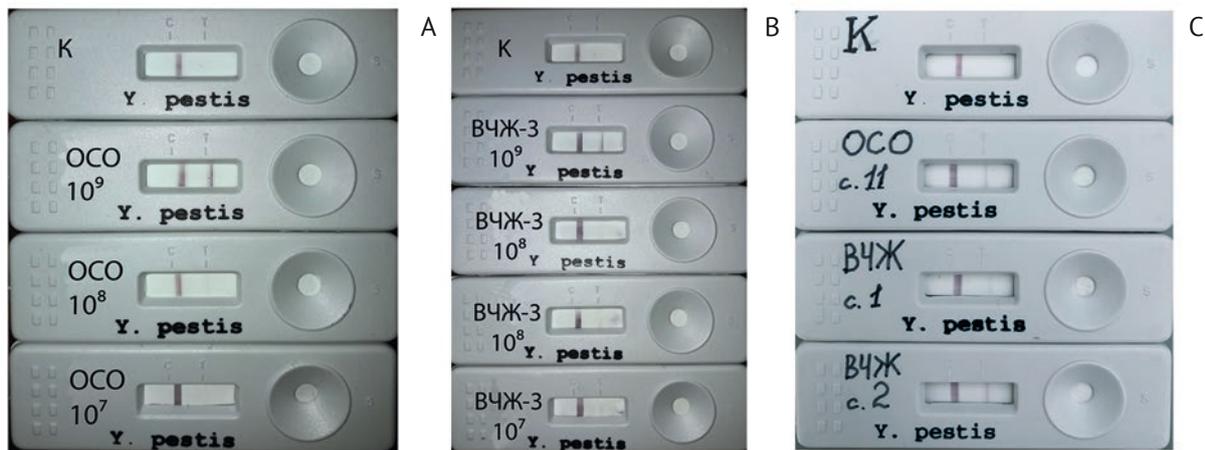


Рис. 3. Результаты испытаний вакцины чумной живой (ВЧЖ) с применением набора реагентов «ИХ тест-система *Y. pestis*» по показателю «Подлинность». А – отраслевой стандартный образец ВЧЖ (OCO 42-28-392) – фармакопейный стандартный образец ФСО 3.2.00392 ВЧЖ серии 10 в концентрации 10^9 , 10^8 , 10^7 м.к./мл. В – ВЧЖ-3 – ВЧЖ коммерческой серии 3-18 в концентрации 10^9 , 10^8 , 10^7 м.к./мл. С – ОСО с. 11 – ФСО 3.2.00392 (OCO 42-28-392) ВЧЖ серии 11 в концентрации, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (10^9 м.к./мл); ВЧЖ с. 1, ВЧЖ с. 2 – ВЧЖ коммерческих серий 1-21 и 2-21 в концентрации 10^9 м.к./мл. На всех рисунках К – контроль – 0,01 М натрий-фосфатный буферный раствор.

Fig. 3. Results of live plague vaccine identification using the ICA System for *Y. pestis*. A, pharmacopoeia standard for live plague vaccines No. ФСО 3.2.00392 (industrial reference material for live plague vaccines No. OCO 42-28-392), batch 10, at concentrations of 10^9 , 10^8 , 10^7 bacterial cells/mL, labelled as “OCO”. B, commercial live plague vaccine, batch 3-18, at concentrations of 10^9 , 10^8 , 10^7 bacterial cells/mL, labelled as “ВЧЖ-3”. C, pharmacopoeia standard for live plague vaccines No. ФСО 3.2.00392 (industrial reference material for live plague vaccines No. OCO 42-28-392), batch 11, at a concentration of 10^9 bacterial cells/mL corresponding to the 10 IU pharmacopoeia standard for bacterial suspension turbidity, labelled as “OCO c.11”; “ВЧЖ с. 1” and “ВЧЖ с. 2”, commercial live plague vaccine, batches 1-21 and 2-21, at a concentration of 10^9 bacterial cells/mL. K, control sample (0.01 M phosphate buffered saline).

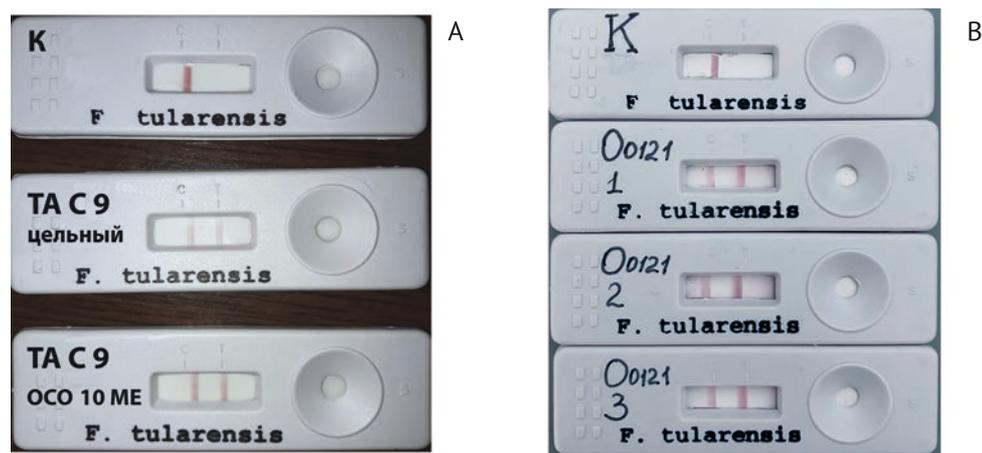


Рис. 4. Результаты испытаний аллергена туляреминого (Тулярина) с применением набора реагентов «ИХ тест-система *F. tularensis*» по показателю «Подлинность». А – ТА С 9 цельный – образец аллергена туляреминого (Тулярина) коммерческой серии О9 (цельный препарат в концентрации $1,0 \times 10^{10}$ м.к./мл), ТА С 9 ОСО 10 МЕ – образец Тулярина в концентрации, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ ($5,0 \times 10^9$ м.к./мл). В – 00121 (1) – образец аллергена туляреминого (Тулярина) коммерческой серии 00121 в концентрации, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ ($5,0 \times 10^9$ м.к./мл); 00121 (2, 3) – образцы Тулярина серии 00121 (цельный препарат в концентрации $1,0 \times 10^{10}$ м.к./мл). На всех рисунках К – контроль – 0,01 М натрий-фосфатный буферный раствор.

Fig. 4. Results of tularaemia allergen (Tularin) identification using the ICA System for *F. tularensis*. A, tularaemia allergen (Tularin), commercial batch O9, at a concentration of 1.0×10^{10} bacterial cells/mL (undiluted), labelled as “ТА С 9 цельный”; and tularaemia allergen (Tularin), commercial batch O9, at a concentration of 5.0×10^9 bacterial cells/mL corresponding to the 10 IU pharmacopoeia standard for bacterial suspension turbidity, labelled as “ТА С 9 ОСО 10 МЕ”. B, tularaemia allergen (Tularin), commercial batch 00121, at a concentration of 5.0×10^9 bacterial cells/mL corresponding to the 10 IU pharmacopoeia standard for bacterial suspension turbidity, labelled as “00121 (1)”; and tularaemia allergen (Tularin), commercial batch 00121, at a concentration of 1.0×10^{10} bacterial cells/mL (undiluted), labelled as “00121 (2, 3)”. K, control sample (0.01 M phosphate buffered saline).

Таким образом, на основании полученных результатов для проведения испытания аллергена туляреминого жидкого (Тулярина) по показателю «Подлинность» иммунохроматографическим методом рекомендуется использовать неразведенный (цельный) препарат по причине незначительности отличий в концентрации цельного и разведенного препарата.

Выводы

1. Иммунохроматографический метод является эффективным экспресс-методом для видоспецифического подтверждения наличия *Y. pestis* в вакцине чумной живой. Рекомендуемая концентрация вакцины чумной живой для проведения испытания по показателю «Подлинность» иммунохроматографическим методом – 10^9 м.к./мл.

2. Иммунохроматографический метод является эффективным экспресс-методом

для видоспецифического подтверждения наличия *F. tularensis* в аллергене туляремином жидком (Тулярин). Проведение испытания по показателю «Подлинность» иммунохроматографическим методом аллергена туляреминого жидкого (Тулярина) рекомендуем проводить с цельным препаратом.

3. Использование иммунохроматографического метода может быть рекомендовано для проведения экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена туляреминого (Тулярина) по показателю «Подлинность».

4. Результаты проведенного исследования могут служить основанием для внесения иммунохроматографического метода в нормативную документацию на вакцину чумную живую и на аллерген туляреминый жидкий (Тулярин) в качестве альтернативного метода определения показателя «Подлинность».

Литература/References

1. Онищенко ГГ, Кутырев ВВ, ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство*. М.: Шико; 2013. Onishchenko GG, Kutyrav VV, eds. *Laboratory diagnosis of dangerous infectious diseases. Practical guide*. Moscow: Shiko; 2013 (In Russ.). EDN: SHFBUN

2. Андрюков БГ, Ляпун ИН, Бынина МП, Матосова ЕВ. Упрощенные форматы современных биосенсоров: 60 лет использования иммунохроматографических тест-систем в лабораторной диагностике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020;65(10):611–8.

- Andryukov BG, Lyapun IN, Bynina MP, Matosova EV. Simplified formats of modern biosensors: 60 years of use immunochromatographic test systems in laboratory diagnostics. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2020;65(10):611–8 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-611-618>
3. 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. Оболенск, 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 Rospotrebnadzor "Biological safety in the modern world"*. April 21–22, 2009. Obolensk, Protvino; 2009. P. 140–2 (In Russ.).
EDN: [UATJPV](#)
 4. Белькова СА, Балахонов СВ, Бикетов СФ, Баранова ЕВ. Апробация иммунохроматографической тест-системы для экспресс-индикации возбудителя чумы. *Журнал инфекционной патологии*. 2009;16(3):69–70.
Belkova SA, Balakhonov SV, Biketov SF, Baranova EV. Practical evaluation of an immunochromatographic test system for rapid indication of the plague agent. *Journal of Infectious Pathology*. 2009;16(3):69–70 (In Russ.).
EDN: [SJLWMR](#)
 5. Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, Foulon J, Ratsitorahina M, Ratsifasoamanana L, et al. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet*. 2003;361(9353):211–6.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12270-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12270-2)
 6. Белькова СА, Балахонов СВ. Индикация капсульного антигена чумного микроба в суспензиях органов мелких млекопитающих с применением иммунохроматографической тест-системы. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2014;(25):96–8.
Belkova SA, Balakhonov SV. Indication of *Yersinia pestis* capsular antigen in suspensions of small mammal organs using immunochromatographic test system. *Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2014;(25):96–8 (In Russ.).
EDN: [TAVIAL](#)
 7. Губарева ТИ, Уланова ГИ. Анализ эффективности применения методов лабораторного исследования на природно-очаговые инфекции. В кн.: *Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней. Шестой сборник научных работ*. Ижевск; 2018. С. 26–8.
Gubareva TI, Ulanova GI. Analysis of the effectiveness of laboratory methods for especially dangerous infections. In: *The most important issues of infectious and parasitic diseases. Sixth collection of scientific works*. Izhevsk; 2018. P. 26–8 (In Russ.).
EDN: [YYQXRR](#)
 8. Холин АВ, Шаракшанов МБ, Вержуцкий ДБ, Корзун ВМ, Оргилбаяр Л, Ганхуяг Ц и др. Результаты эпизоотологического обследования приграничной с Россией части Хархира-Тургенского природного очага чумы Монголии в 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(2):129–34.
Kholin AV, Sharakshanov MB, Verzhutsky DB, Korzun VM, Orgilbayar L, Gankhuyag T, et al. Results of epizootiological survey along the border areas of Kharkhira-Turgensky natural plague focus between Russia and Mongolia in 2019. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(2):129–34 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-129-134>
 9. Еремкин АВ, Елагин ГД, Печенкин ДВ, Фоменков ОО, Богачева НВ, Кытманов АА и др. Разработка иммуноферментной и иммунохроматографической моноклональных тест-систем для выявления возбудителя туляремии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;61(3):184–7.
Eremkin AV, Elagin GD, Pechenkin DV, Fomenkov OO, Bogatcheva NV, Kitmanov AA, et al. The development of immune enzyme and immune chromatographic monoclonal test-systems for detecting tularemia agent. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;61(3):184–7 (In Russ.).
EDN: [VXLOFZ](#)
 10. Кретенчук О.Ф. Отечественные средства диагностики особо опасных инфекций на основе моноклональных антител. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(4):35–45.
Kretenchuk O.F. Domestically-produced monoclonal-antibody-based means of diagnosing particularly dangerous infections. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(4):35–45 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-4-35-45>
 11. Зайцев АА, Гнусарева ОА, Солодовников БВ, Царева НС, Остапович ВВ, Куличенко АН. Алгоритм лабораторной диагностики при исследовании иксодовых клещей на туляремию. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012;(3):79–81.
Zaitsev AA, Gnusareva OA, Solodovnikov BV, Tsareva NS, Ostapovich VV, Kulichenko AN. Algorithm of laboratory diagnostics applied for examination of ixodic ticks for tularaemia. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2012;(3):79–81 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-3-79-81>
 12. Зайцев АА, Гнусарева ОА, Царева НС, Остапович ВВ, Борздова ИЮ, Куличенко АН. Применение иммунохроматографических тест-систем для экспресс-выявления липополисахарида *Francisella tularensis* при мониторинге природных очагов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; (1):78–80.
Zaitsev AA, Gnusareva OA, Tsareva NS, Ostapovich VV, Borzdova IYu, Kulichenko AN. Immuno-chromatographic test system application for

- rapid detection of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide in monitoring of natural foci. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2013;(1):78–80 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-1-78-80>
13. Касина ИВ, Алексеева СА, Бердникова ЗЕ, Немировская ТИ, Алехина АС. Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной живой. *Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение*. 2017;17(4):240–7.
 Kasina IV, Alekseeva SA, Berdnikova ZE, Nemirovskaya TI, Alekhina AS. Prospects for improving evaluation of live tularaemia vaccine quality. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(4):240–7 (In Russ.).
 EDN: [ZXGLLX](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-1-78-80)
14. Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Теоретическое и экспериментальное обоснование перспективных методов экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(4):277–84.
 Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. Theoretical and experimental substantiation of alternative methods for quality control of live anthrax vaccine. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):277–84 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-277-284>
15. Поздеев ОК. *Медицинская микробиология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
 Pozdeev OK. *Medical microbiology*. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (In Russ.).
 EDN: [QLFKVB](https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-277-284)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.В. Касина** — дизайн и теоретическое обоснование исследования; экспериментальная работа по определению показателя качества «Подлинность» вакцины чумной живой; обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов; написание, редактирование и критическое обсуждение текста рукописи; **С.А. Алексеева** — экспериментальная работа по определению показателя качества «Подлинность» аллергена туляремийного (Тулярина); анализ и интерпретация результатов исследования; написание текста рукописи; **Т.И. Немировская** — концепция работы, критическое обсуждение текста рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

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

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **I.V. Kasina** designed the study, provided the theoretical framework for the study, carried out identification testing of the live plague vaccine, summarised the experimental data, analysed and interpreted the results, drafted and critically revised the manuscript. **S.A. Alekseeva** carried out identification testing of the tularaemia allergen (Tularin), analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript. **T.I. Nemirovskaya** conceptualised the study, critically revised the manuscript and approved the final version for publication.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

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

Об авторах / Authors

Касина Ирина Владимировна, канд. биол. наук
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2002-0151>
kasina@expmed.ru

Алексеева Светлана Александровна, канд. биол. наук
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5804-5709>
alekseevas@expmed.ru

Немировская Татьяна Ивановна, канд. мед. наук
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0848-7306>
nemirovskaya@expmed.ru

Поступила 02.06.2022

После доработки 07.04.2023

Принята к публикации 07.06.2023

Irina V. Kasina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2002-0151>
kasina@expmed.ru

Svetlana A. Alekseeva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5804-5709>
alekseevas@expmed.ru

Tatiana I. Nemirovskaya, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0848-7306>
nemirovskaya@expmed.ru

Received 2 June 2022

Revised 7 April 2023

Accepted 7 June 2023