



Перспективы применения метода проточной цитометрии в оценке качества препарата вакцины чумной живой

Н.В. Абзаева , И.В. Кузнецова, С.Е. Гостищева, А.М. Жиров, Д.А. Ковалев, А.В. Костроминов, А.А. Фисун, Г.Ф. Иванова

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Советская, д. 13–15, г. Ставрополь, 355035, Российская Федерация

✉ Абзаева Наталья Вячеславовна; stavnipchi@mail.ru

Резюме

Актуальность. Показатель качества «Количество живых микробных клеток» определяется на всех этапах производства вакцины чумной живой. В настоящее время для определения количества живых микробных клеток используют бактериологический метод. Однако для повышения точности анализа и сокращения времени его проведения перспективным представляется использование метода проточной цитометрии.

Цель. Изучить возможность применения метода проточной цитометрии в оценке качества препарата вакцины чумной живой.

Материалы и методы. Использовали экспериментальные серии вакцины чумной живой (пять серий). Изучение показателя качества «Количество живых микробных клеток» в препарате вакцины проводили бактериологическим методом согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ФС.3.3.1.0022.15). Цитофлуориметрический анализ образцов проводили с использованием флуоресцентного красителя SynaptoGreen.

Результаты. Проведена оценка значения количества живых микробных клеток в образцах вакцин бактериологическим методом, что составило от $27,8 \pm 2,2$ до $56,5 \pm 3,1\%$ (в среднем — $39,8 \pm 5,4\%$), и методом проточной цитометрии — от $29,2 \pm 1,2$ до $59,1 \pm 2,1\%$, (в среднем — $41,7 \pm 5,5\%$). Статистическая обработка данных показала, что результаты контроля качества препарата вакцины, полученные обоими методами, не имели достоверных различий и характеризовались высоким коэффициентом детерминации.

Выводы. Показана целесообразность применения метода проточной цитометрии при контроле качества препарата чумной вакцины при определении количества живых микробных клеток. Высокая информативность, быстрота и простота выполнения анализа делают метод проточной цитометрии более предпочтительным в сравнении с традиционными методами анализа.

Ключевые слова: метод проточной цитометрии; вакцина чумная живая; контроль качества; количество живых микробных клеток; бактериологический метод

Для цитирования: Абзаева Н.В., Кузнецова И.В., Гостищева С.Е., Жиров А.М., Ковалев Д.А., Костроминов А.В., Фисун А.А., Иванова Г.Ф. Перспективы применения метода проточной цитометрии в оценке качества препарата вакцины чумной живой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(4):560–569. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-560-569>

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

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

Prospects for using flow cytometry in the quality control of live plague vaccines

Natalia V. Abzaeva ✉, Irina V. Kuznetsova, Svetlana E. Gostischeva, Andrey M. Zhirov, Dmitry A. Kovalev, Artem V. Kostrominov, Alisa A. Fisun, Galina F. Ivanova

Stavropol Plague Control Research Institute, 13–15 Sovetskaya St., Stavropol 355035, Russian Federation

✉ Natalia V. Abzaeva; stavnipchi@mail.ru

Abstract

Scientific relevance. The number of live bacteria is a quality parameter controlled at all stages of live plague vaccine production. Currently, live microbial cell counting uses a bacteriological method. However, flow cytometry has the potential to increase analytical accuracy and reduce testing time.

Aim. This study aimed at testing the applicability of flow cytometry to assessing the quality of live plague vaccines.

Materials and methods. The study quantified live microbial cells in 5 experimental batches of live plague vaccine as part of their quality control using the bacteriological method according to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (FS.3.3.1.0022.15). Cytofluorometry of the samples used the SynaptoGreen fluorescent dye.

Results. The study quantified live microbial cells in live plague vaccine samples using the bacteriological method and flow cytometry. The results obtained by the bacteriological method ranged from 27.8±2.2 to 56.5±3.1% with an average of 39.8±5.4%. The results obtained by flow cytometry ranged from 29.2±1.2 to 59.1±2.1% with an average of 41.7±5.5%. The statistical analysis showed no significant difference between the results of vaccine quality control by both methods, as well as a high coefficient of determination.

Conclusions. The results show that flow cytometry is an appropriate method for the quantification of live microbial cells as part of the quality control of plague vaccines. Being quick, easy, and highly informative, flow cytometry is preferable to traditional methods.

Keywords:

flow cytometry; live plague vaccine; quality control; number of live bacteria; percentage of live microbial cells; bacteriological method

For citation:

Abzaeva N.V., Kuznetsova I.V., Gostischeva S.E., Zhirov A.M., Kovalev D.A., Kostrominov A.V., Fisun A.A., Ivanova G.F. Prospects for using flow cytometry in the quality control of live plague vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):560–569. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-560-569>

Funding. The study was performed without external funding.

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

Введение

Выпускаемый в Российской Федерации¹ препарат вакцины чумной живой представляет собой лиофилизат вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. Препарат применяется по эпидемическим показаниям для специфической иммунопрофилактики. Показатель качества «Количество живых микробных клеток» определяется на всех этапах производства вакцины: получение посевной культуры, накопление биомассы, фасовка препарата, лиофильное высушивание. Данный показатель особенно

важен для подтверждения качества получаемой биомассы. Количество живых микробных клеток препарата определяется не только на этапах изготовления и контроля качества вакцины, но и в течение срока годности, что позволяет изучить стабильность препарата при хранении. Косвенно данный показатель влияет на иммуногенность вакцины – способность обеспечить надежную противои инфекционную защиту.

Согласно нормативной документации на препарат значение показателя «Количество живых микробных клеток» должно составлять

¹ Государственный реестр лекарственных средств https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=a55e6d43-fef5-4c3d-af16-a15f6b065685

не менее 25% от общего числа². В настоящее время в производстве вакцины чумной живой для определения количества живых микробных клеток используют бактериологический метод³. В то же время существует ряд других методов, к которым относятся биохимические и циторефрактометрические методы, а также новые инструментальные подходы (проточная цитофлуориметрия и биолюминесцентные методы), позволяющие оценить физиологическое состояние бактериальной клетки после лиофильного высушивания, в ходе которого из-за повреждения клеточной стенки и цитоплазматической мембраны может происходить частичная гибель клеток.

Бактериологический метод позволяет определять количество живых бактерий – колониеобразующих единиц (КОЕ) по числу колоний, выросших на плотной питательной среде. Процент живых микробных клеток вычисляют в виде соотношения числа выросших колоний к общей концентрации микробных клеток, определенной визуальным методом с помощью отраслевого стандартного образца мутности 10 МЕ (ОСО 42-28- 85 соответствующего года выпуска).

Данная методика определения количества живых микробных клеток в препарате является достаточно трудоемкой и позволяет получить результат через несколько суток. Кроме того, среди факторов, влияющих на результаты методики, можно выделить качество питательных сред для высева вакцинной суспензии, химическую чистоту используемой посуды, адсорбцию микроорганизмов на поверхности стекла пипетки и др.

Для определения количества живых микроорганизмов возможно использование экспресс-методов, значительно сокращающих время анализа.

Аналогом бактериологического метода является метод мембранной фильтрации, принцип которого заключается в том, что после пропускания анализируемой пробы через фильтр, на поверхности которого остаются присутствующие в пробе микроорганизмы, фильтр помещают на плотную питательную среду, инкубируют в соответствующих условиях и подсчитывают число видимых колоний.

В качестве биохимического метода оценки показателя используют определение дегидрогеназной активности бактерий в отношении метиленового синего. Метод основан на том,

что окисленная форма метиленового синего, имеющая синюю окраску, при соединении с атомом водорода, отщепляемым от органического субстрата дегидрогеназой, переходит в восстановленную бесцветную форму [1]. По окончании реакции по формуле рассчитывают количество живых микробных клеток, учитывая время протекания реакции в сравнении с заранее определенным эталоном [2]. Для каждого производственного цикла составляют градуированные шкалы соответствия времени обесцвечивания красителя количеству жизнеспособных микробных клеток. При этом для составления шкал соответствия используется культуральный метод.

Также к биохимическим методам относится определение количества восстановленного трифенилтетразол-хлорида, который под действием митохондриальных дегидрогеназ живых клеток превращается в нерастворимый в воде формазан, имеющий фиолетовую окраску [3]. С учетом значения оптической плотности растворенных кристаллов формазана проводится расчет процента жизнеспособных микробных клеток по формуле. Для каждого опыта кривая составляется индивидуально с помощью фотоэлектроколориметра, при этом для расчета коэффициента восстановления тетразола из одного образца вакцинного препарата жизнеспособность определяют культуральным методом.

Метод окраски селективными кислотными или основными красителями (феноловый красный, цианол, трипановый синий, нейтральный красный) позволяет различить живые (бесцветные) и погибшие (темно-синие) микробные клетки, произвести подсчет их числа под оптическим микроскопом и определить процентное содержание жизнеспособных клеток как отношение количества живых клеток к общему числу [4].

Циторефрактометрический метод основан на различиях в оптических свойствах живых и мертвых микробных клеток, выявляемых при просмотре с использованием иммерсионной аноптральной микроскопии [5]. Однако данный метод предпочтителен для использования на этапе анализа нативной биомассы или препарата со сроком годности до трех месяцев.

Биолюминесцентный метод, основанный на определении содержания аденозинтрифосфата (АТФ) в микробных клетках [6, 7], позволяет сократить длительность анализа до 6 ч, однако

² Нормативная документация ЛСР-005758/08-231120. Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций; 2020.

³ ФС.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.

недостатком метода является необходимость подбора и оптимизации условий пробоподготовки для каждого конкретного образца.

Следует отметить, что, несмотря на быстроту проведения описанных методик, они не являются оптимальными, так как зачастую предполагают длительный период пробоподготовки.

Метод проточной цитометрии основан на анализе параметров светорассеяния и интенсивности флуоресценции каждой индивидуальной клетки в суспензии [8–11]. Метод может использоваться для определения количества живых микробных клеток лиофилизированных вакцин, так как именно в процессе высушивания происходит наиболее интенсивная гибель микробных клеток, сопровождающаяся нарушением целостности клеточной оболочки [12], что позволяет флуоресцентному красителю проникнуть внутрь поврежденной клетки.

Таким образом, анализ существующих в настоящее время методик учета количества живых микробных клеток показал, что выбор способа определения данного показателя применительно к контролю качества иммунобиологических лекарственных препаратов является актуальной задачей.

Цель работы – изучить возможность применения метода проточной цитометрии в оценке качества препарата вакцины чумной живой.

Для достижения данной цели было необходимо определить количество живых микробных клеток в препарате вакцины чумной живой методом проточной цитометрии и бактериологическим методом, провести сравнительный анализ данных, полученных двумя методами.

Материалы и методы

Материалы:

- исследуемый образец: вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций (ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора), пять экспериментальных серий (1-эксп, 2-эксп, 3-эксп, 4-эксп, 5-эксп, срок годности до 21.03.2024);
- агар Хоттингера pH 7,2±0,1 с натрием сернистокислым 0,25 г/л (ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора);
- 0,9% натрия хлорид (хч) ГОСТ 4233-77 (ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт»

Роспотребнадзора);

- краситель SynaptoGreen (C4/FM1–43) (Invitrogen, США).

Оборудование:

- проточный цитометр Attune (Thermo Scientific, США) с программным обеспечением Attune cytometric software (Thermo Scientific, США);
- бокс микробиологической безопасности II класса LA2 Labculture (ESCO Technologies Inc., США);
- микроцентрифуга-встряхиватель ТЭТА 2 (ООО «Биоком», Россия).

Методы

При выполнении работ руководствовались требованиями санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»⁴.

Бактериологический метод. Определение количества живых микробных клеток проводили согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации, ФС.3.3.1.0022.15 «Вакцина чумная живая»⁵.

Метод проточной цитометрии

Подготовка исследуемого образца вакцины. В ампулу с лиофилизированным препаратом вакцины добавляли 5 мл 0,9% раствора натрия хлорида и растворяли в течение 3 мин. Полученную взвесь переносили в пластиковую пробирку (Eppendorf, Германия) объемом 15 мл. В ампулу вновь добавляли 5 мл 0,9% раствора натрия хлорида, аккуратно встряхивали и переносили содержимое в ту же пробирку.

Окраска препарата. В пробирку типа Эппендорф (Eppendorf, Германия) вносили 100 мкл подготовленного образца вакцины, добавляли 7 мкл красителя SynaptoGreen и оставляли при комнатной температуре в защищенном от света месте на 10 мин. Доводили объем окрашенной взвеси до 1 мл 0,9% раствором натрия хлорида.

Приготовление отрицательного контрольного образца. В качестве отрицательного образца применяли препарат убитых прогреванием микробных клеток, для приготовления которого отбирали 100 мкл образца вакцины и нагревали при 100 °С в течение 40 мин. После этого проводили окраску препарата вышеописанным способом.

⁴ Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4).

⁵ ФС.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.

Определение количества живых микробных клеток. Для точного определения границ субпопуляции мертвых клеток однократно перед началом измерений проводили установление границ этой субпопуляции. Помещали пробирку с окрашенным отрицательным контролем в штатив-держатель цитометра и измеряли флуоресценцию. Исследование проводили согласно инструкции к прибору. Флуоресценцию измеряли при длине волны 440 ± 50 и 512 ± 25 нм с использованием фильтров VL1-H и VL2-H соответственно.

Аналогично проводили определение количества живых клеток в препарате вакцины чумной живой.

Обработка, статистический анализ и визуализация данных проводились с использованием языка R версия 4.0.3⁶, пакетов ggplot2⁷ и ggpubr⁸. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для проведения оценки количества жизнеспособных микробных клеток вакцины чумной живой методом проточной цитометрии

на первом этапе исследования анализировали отрицательный контрольный образец – препарат убитых прогреванием микробных клеток. Оценка количества клеток проводилась путем добавления флуоресцентного красителя SynaptoGreen, не способного проникать внутрь неповрежденной (живой) микробной клетки. Особенностью данного красителя является спектральная чувствительность к составу окружающей среды за счет эффектов релаксации и самотушения – при взаимодействии с живой клеткой происходит окрашивание липофильной мембраны с относительно слабой флуоресценцией в синей области спектра, а при локализации красителя в гидрофильной среде (в том числе в цитоплазме разрушенной клетки) происходит сдвиг максимума флуоресцентного сигнала в красную область спектра, сопровождающийся повышением интенсивности флуоресценции [13].

Результаты цитометрического анализа препарата убитых прогреванием микробных клеток *Y. pestis* представлены в виде двумерной диаграммы (диаграмма светорассеивания), где каждой клетке соответствует точка и показано распределение кластера живых и мертвых клеток внутри общей популяции (рис. 1).

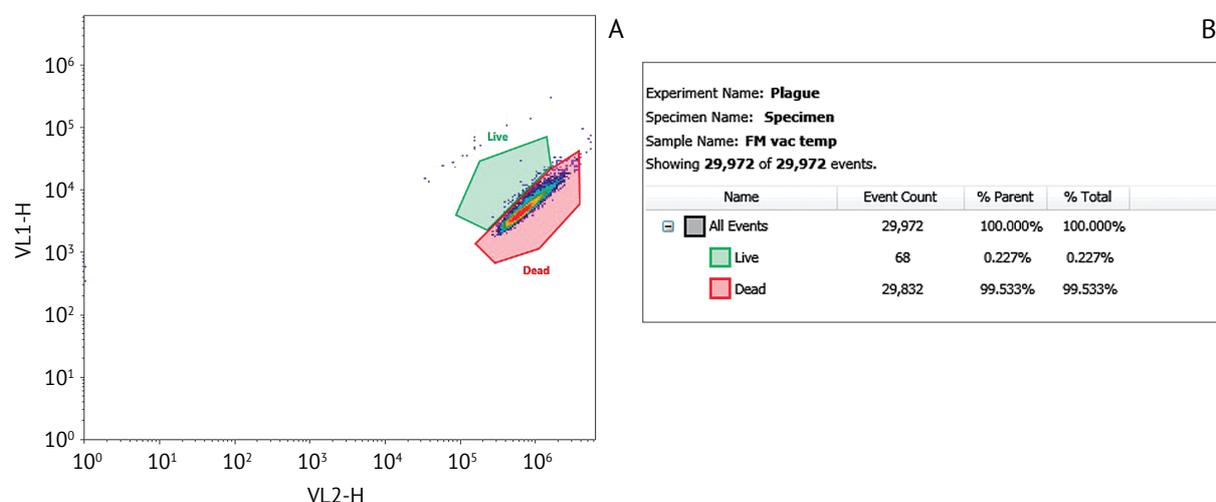


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Результаты цитометрического анализа отрицательного контрольного образца – препарата убитых прогреванием микробных клеток. А – диаграмма светорассеивания клеток. По оси X – интенсивность флуоресценции при длине волны 512 ± 25 нм; по оси Y – интенсивность флуоресценции при длине волны 440 ± 50 нм. Красным цветом выделена область, содержащая мертвые микробные клетки, зеленым цветом – живые клетки. В – автоматически рассчитанные программой результаты цитометрического анализа в виде количества мертвых (dead) и живых (live) клеток (скриншот).

Fig. 1. Flow cytometry results for the negative control sample (preparation of heat-killed microbial cells). A, scatter plot for the cells. X-axis: fluorescence intensity at 512 ± 25 nm; Y-axis: fluorescence intensity at 440 ± 50 nm. Red: dead cells; green: live cells. B, flow cytometry results automatically calculated by the program as live and dead microbial cell counts and percentages (screenshot).

⁶ <https://www.r-project.org/>

⁷ Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag. New York; 2016.

⁸ <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>

С использованием метода проточной цитометрии была проведена оценка количества жизнеспособных микробных клеток в пяти экспериментальных сериях вакцины чумной живой. Каждая серия исследовалась в трех повторах. Для подтверждения достоверности полученных результатов параллельно определяли количество живых микробных клеток в исследуемых образцах бактериологическим методом. Полученные результаты представлены в *таблице 1*.

Значение количества живых микробных клеток при анализе образцов экспериментальных серий вакцины бактериологическим методом составило от 27,8±2,2 до 56,5±3,1% (в среднем – 39,8±5,4%), а при исследовании цитометрическим методом – от 29,2±1,2 до 59,1±2,1% (в среднем – 41,7±5,5%).

Наблюдаемый разброс значений показателя количества живых микробных клеток в экспериментальных сериях вакцины чумной живой является допустимым – показатель должен быть не менее 25%⁹. При этом вне зависимости от способа определения в пределах одной серии препарата данный показатель находился в границах доверительного интервала. Разница между данными, полученными как для каждой серии, так и для среднего значения, не превышала 3%, что подтверждает согласованность методик.

Результаты цитометрического анализа препарата вакцины чумной живой на примере образца пятой экспериментальной серии вакцины представлены на *рисунке 2*.

При статистическом анализе полученных данных было установлено, что результаты контроля качества препарата вакцины методом проточной цитометрии и бактериологическим методом

не имели достоверных различий (*t*-критерий Стьюдента, $p < 0,05$) и характеризовались высоким коэффициентом детерминации (R^2 , $p < 0,05$). На *рис. 3* представлены результаты корреляционного анализа между значениями показателя количества живых микробных клеток, установленными бактериологическим методом и методом проточной цитометрии – синим цветом обозначена линия тренда, серым – границы 95% доверительного интервала.

Диаграмма рассеяния разности количества живых микробных клеток и средних значений полученных результатов измерений (диаграмма Блэнда–Альтмана) представлена на *рис. 4*. Средняя разность значений измерений (среднее арифметическое, $mean \pm$ стандартное отклонение, *SD*) составила 1,82±0,83%, что свидетельствует о наличии незначительного систематического расхождения. Значимых линейных взаимосвязей между разностью и средними значениями обнаружено не было (корреляция Пирсона, $p > 0,05$). Эти данные, а также расположение всех значений измерений в пределах средней разности ($\pm 1,96 SD$) отражают согласованность двух методов измерения показателя количества живых микробных клеток.

Полученные данные свидетельствуют о высокой точности метода проточной цитофлуориметрии при определении количества живых микробных клеток. В мировой практике данный метод используется в различных областях промышленности и науки, например при определении эффективности дезинфицирующих средств в отношении микроорганизмов [15], изучении влияния химических соединений на проницаемость бактериальной клетки [16], для оценки количества живых микробов в условиях промышленного металлургического производства

Таблица 1. Сравнительная оценка количества живых микробных клеток экспериментальных серий препарата вакцины чумной живой

Table 1. Comparison of live microbial cell quantification results for experimental batches of live plague vaccine

Серия препарата вакцины <i>Vaccine batch</i>	Общее количество микробных клеток, млрд/мл <i>Total microbial cell count, bn/mL</i>	Количество живых микробных клеток, % от общего количества клеток <i>Number of live bacteria as % of total microbial cell count</i>	
		Бактериологический метод <i>Bacteriological method</i>	Цитометрический метод <i>Flow cytometry</i>
1	50	27,8±2,2	29,2±1,2
2	50	39,9±1,4	40,8±2,3
3	55	56,5±3,1	59,1±2,1
4	70	33,9±0,7	36,7±1,5
5	65	41,1±0,9	42,5±0,5

Таблица составлена авторами по собственным данным [14] с изменениями / The table is prepared by the authors using their own data and [14]

⁹ Нормативная документация ЛСР-005758/08-231120. Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций; 2020.

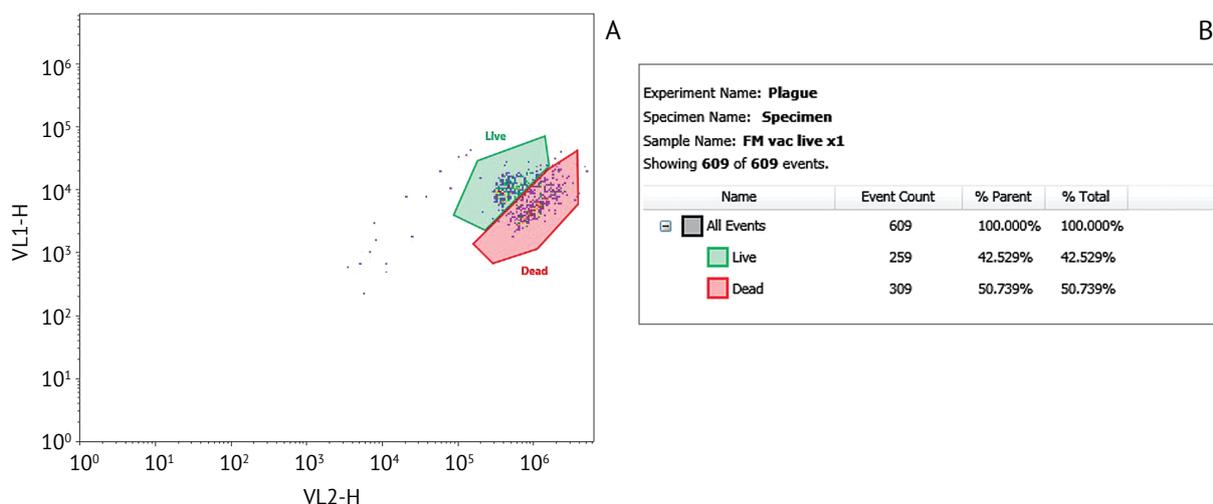


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Результаты цитометрического анализа препарата вакцины чумной живой. А – диаграмма светорассеивания клеток. По оси X – интенсивность флуоресценции при длине волны 512 ± 25 нм; по оси Y – интенсивность флуоресценции при длине волны 440 ± 50 нм. Красным цветом выделена область, содержащая мертвые микробные клетки, зеленым цветом – живые клетки. В – автоматически рассчитанные программой результаты цитометрического анализа в виде количества мертвых (dead) и живых (live) клеток (скриншот).

Fig. 2. Flow cytometry results for the live plague vaccine. A, scatter plot for microbial cells. X-axis: fluorescence intensity at 512 ± 25 nm; Y-axis: fluorescence intensity at 440 ± 50 nm. Red: dead cells; green: live cells. B, flow cytometry results automatically calculated by the program as live and dead microbial cell counts and percentages (screenshot).

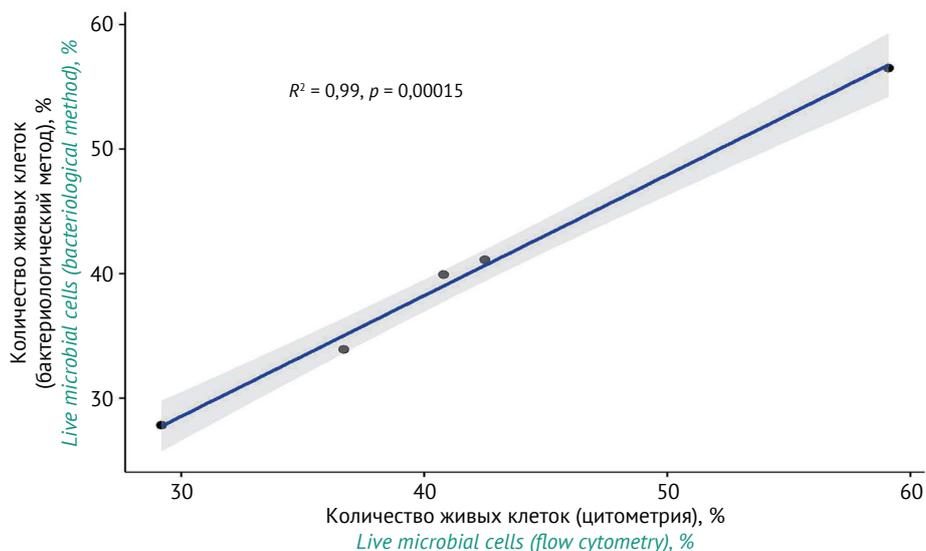


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Результаты корреляционного анализа между значениями количества живых микробных клеток, установленными бактериологическим методом и методом проточной цитометрии. Синим цветом обозначена линия тренда, серым – границы 95% доверительного интервала.

Fig. 3. Correlation between the results of live microbial cell quantification by bacteriological and flow cytometry methods. Blue: trend line; grey: 95% confidence interval.

[17] и др. Метод проточной цитометрии характеризуется как надежный и стабильный экспресс-метод [18].

Результаты проведенного исследования продемонстрировали возможность применения цитометрического метода для контроля качества

препарата вакцины чумной при определении показателя количества живых микробных клеток. Данный метод позволяет упростить проведение анализа показателя и значительно сократить время его проведения. Метод проточной цитометрии позволяет напрямую анализировать

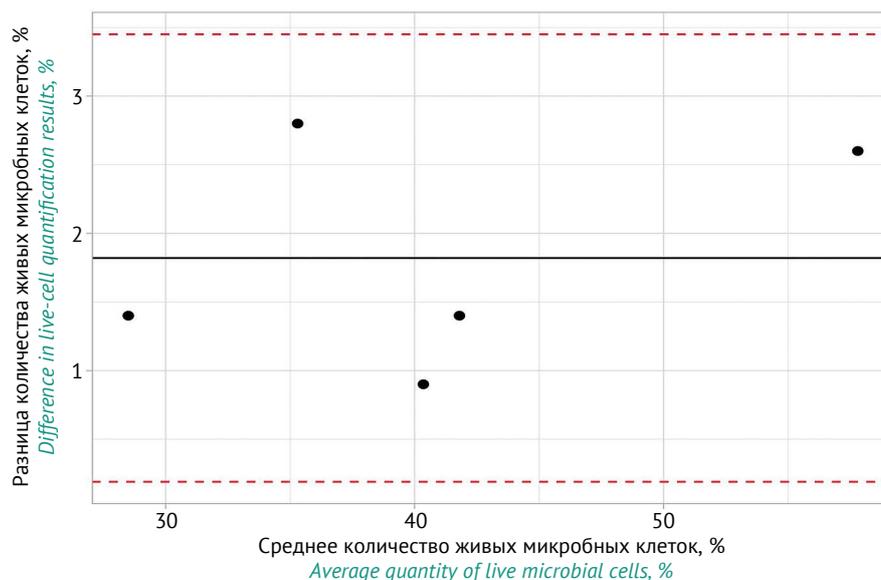


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Результаты анализа согласованности методов определения количества живых микробных клеток. По оси X – среднее количество живых микробных клеток, определенное бактериологическим и цитометрическим методами; по оси Y – разница значений количества живых микробных клеток, определенных бактериологическим и цитометрическим методами. Сплошной линией указано среднее значение разности количества живых микробных клеток, определенное бактериологическим и цитометрическим методами; пунктирной – 95% доверительный интервал среднего значения разности показателей.

Fig. 4. Consistency of the methods for live microbial cell quantification. X-axis: average quantity of live microbial cells determined by bacteriological and flow cytometry methods; Y-axis: difference in the results obtained by bacteriological and flow cytometry methods. Solid line: average difference in the results obtained by bacteriological and flow cytometry methods; dotted line: 95% confidence interval.

весь объем вакцинной суспензии в образце (ампуле), не используя последовательное титрование до необходимого разведения с последующим высевом части разведенной суспензии на питательные среды.

Выводы

Значение показателя качества «Количество живых микробных клеток» в экспериментальных сериях препарата вакцины чумной живой, установленное методом проточной цитометрии, составило от $29,2 \pm 1,2$ до $59,1 \pm 2,1\%$, что полностью соответствует требованиям нормативной документации. При сравнительном исследовании образцов бактериологическим методом показано, что значение показателя составило от $27,8 \pm 2,2$ до $56,5 \pm 3,1\%$, при этом в пределах каждой серии различие полученных данных не являлось достоверным и разница составила не более 3%.

Литература/References

1. Касина ИВ, Ращепкин ЛИ, Горяев АА, Алексеева СА, Немировская ТИ, Мовсесянц АА. Оценка качества вакцины туляремийной живой по результатам испытаний в рамках обязательной сертификации.

Применение метода проточной цитофлуориметрии позволило увеличить информативность, упростить определение исследуемого показателя, сократить время проведения анализа и исключить факторы, способные повлиять на результаты (например, некачественные питательные среды).

Показана целесообразность практического применения и перспектива метода цитометрии для определения показателя количества живых микробных клеток при контроле качества препарата вакцины чумной живой, а также, возможно, и для других иммунобиологических лекарственных препаратов.

Включение описанной методики в нормативную документацию позволит использовать ее для контроля качества вакцины чумной живой наряду с регламентированными методами.

БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2016;16(4):253–9.

Kasina IV, Raschepkin LI, Goryaev AA, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI, Movsesyants AA. Live tularemia vac-

- cine quality assessment according to test results under the mandatory certification. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(4):253–9 (In Russ.). EDN: [UWBNNH](#)
- Fukui M, Takii S. Reduction of tetrazolium salts by sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*. 1989;62(1):13–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03653.x>
 - Bhupathiraju VK, Hernandez M, Landfear D, Alvarez-Cohen L. Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. *J Microbiol Methods*. 1999;37(3):231–43. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(99\)00069-x](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(99)00069-x)
 - Johnson MB, Criss AK. Fluorescence microscopy methods for determining the viability of bacteria in association with mammalian cells. *J Vis Exp*. 2013;(79):e50729. <https://doi.org/10.3791/50729>
 - Фихман БА. Иммерсионная микрорефрактометрия бактериальных клеток. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1963;(5). Fikhman BA. Immersion microrefractometry of bacterial cells. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1963;(5) (In Russ.).
 - Ломакина ГЮ, Модестова ЮА, Угарова НН. БиOLUMИнесцентная детекция жизнеспособности клеток (обзор). *Биохимия*. 2015;80(6):829–44. Lomakina GYu, Modestova YuA, Ugarova NN. Bioluminescence assay of cell viability. *Biochemistry*. 2015;80(6):829–44 (In Russ.). EDN: [UAAWWF](#)
 - Угарова НН, Ломакина ГЮ, Перевышина ТА, Отрашевская ЕВ, Черников СВ. Контроль жизнеспособности клеток БЦЖ-вакцины в процессе ее производства методом биOLUMИнесцентной АТФ-метрии. *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2019;60(4):254–62. Ugarova NN, Lomakina GYu, Perevyshina TA, Otrashvskaya EV, Chernikov SV. In-process control of BCG vaccine cell viability by bioluminescent ATP assay. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2019;60(4):254–62 (In Russ.). EDN: [TVEZMT](#)
 - Ou F, McGoverin C, Swift S, Vanholsbeeck F. Rapid and cost-effective evaluation of bacterial viability using fluorescence spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2019;411(16):3653–63. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01848-5>
 - Shimomura Y, Ohno R, Kawai F, Kimbara K. Method for assessment of viability and morphological changes of bacteria in the early stage of colony formation on a simulated natural environment. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(7):5037–42. <https://doi.org/10.1128/AEM.00106-06>
 - Pianetti A, Falcioni T, Bruscolini F, Sabatini L, Sisti E, Papa S. Determination of the viability of *Aeromonas hydrophila* in different types of water by flow cytometry, and comparison with classical methods. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(12):7948–54. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7948-7954.2005>
 - Gweon E, Choi C, Kim J, Kim B, Kang H, Park T, et al. Development of a new approach to determine the potency of bacille Calmette–Guérin vaccines using flow cytometry. *Osong Public Health Res Perspect*. 2017;8(6):389–96. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2017.8.6.06>
 - Лопатина НВ, Мишанькин БН. Экспериментальная адаптация вакцинного штамма чумного микроба к процессу лиофилизации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018;17(3):51–6. Lopatina NV, Mishankin BN. Experimental adaptation of a strain of the plague microbe to lyophilization process. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2018;17(3):51–6 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-3-51-56>
 - Massicotte R, Mafu AA, Ahmad D, Deshaies F, Pichette G, Belhumeur P. Comparison between flow cytometry and traditional culture methods for efficacy assessment of six disinfectant agents against nosocomial bacterial species. *Front Microbiol*. 2017;8:112. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00112>
 - Фисун АА, Абзаева НВ, Ковалев ДА, Кузнецова ИВ, Жиров АМ, Гостищева СЕ и др. Определение количества живых микробных клеток в препарате вакцины чумной живой методом проточной цитометрии. В кн.: *Материалы региональной научно-практической конференции с международным участием «Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе»*. Ставрополь; 2022. С. 217–8. Fisun AA, Abzaeva NV, Kovalev DA, Kuznetsova IV, Zhiron AM, Gostishcheva SE, et al. Determination of the number of living microbial cells in the preparation of live plague vaccine by flow cytometry. In: *Materials of the regional scientific and practical conference with the international participation “Problems of especially dangerous infections in the North Caucasus”*. Stavropol; 2022. P. 217–8 (In Russ.). EDN: [YMVOOI](#)
 - Shi L, Gunther S, Hubschmann T, Wick LY, Harms H, Muller S. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry A*. 2007;71(8):592–8. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20402>
 - Vanhauteghem D, Demeyere K, Callaert N, Boelaert A, Haesaert G, Audenaert K, et al. Flow cytometry is a powerful tool for assessment of the viability of fungal conidia in metalworking fluids. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(16):e00938-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00938-17>
 - Zahavy E, Rotem S, Gur D, Aloni-Grinstein R, Aftalion M, Ber R. Rapid antibiotic susceptibility determination for *Yersinia pestis* using flow cytometry Spectral Intensity Ratio (SIR) fluorescence analysis. *J Fluoresc*. 2018;28(5):1151–61. <https://doi.org/10.1007/s10895-018-2279-3>
 - Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A, Acs A, Adam D, Adam-Klages S, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol*. 2019;49(10):1457–973. <https://doi.org/10.1002/eji.201970107>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Н.В. Абзаева** – сбор, анализ и обобщение данных литературы, интерпретация результатов исследования, оформление текста рукописи; **И.В. Кузнецова** – проведение экспериментальных исследований и сравнительного анализа красителей; сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; **С.Е. Гостищева** – культивирование вакцинного штамма, разработка концепции исследования, окончательное редактирование текста рукописи для публикации; **А.М. Жиров** – пробоподготовка образцов и реагентов, подготовка графического материала; **Д.А. Ковалев** – планирование и разработка дизайна экспериментального исследования, редактирование и критический пересмотр содержания рукописи, формулирование выводов; **А.В. Костроминов** – культивирование клеток, получение экспериментальных данных, оформление рукописи; **А.А. Фисун** – культивирование клеток, сбор экспериментальных данных; **Г.Ф. Иванова** – культивирование клеток, обоснование концепции исследования, обобщение и систематизация результатов исследования.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **N.V. Abzaeva** collected, analysed, and summarised literature data; interpreted the study results; and formatted the manuscript. **I.V. Kuznetsova** conducted experiments and dye comparisons; collected, analysed, and collated experimental data. **S.E. Gostischeva** cultivated the vaccine strain, conceptualised the study, and finalised manuscript editing for publication. **A.M. Zhirov** prepared samples and reagents and worked with the graphical material. **D.A. Kovalev** planned and designed the study, edited and critically reviewed the manuscript, and formulated the conclusions. **A.V. Kostrominov** cultivated cells, generated experimental data, and formatted the manuscript. **A.A. Fisun** cultivated cells and generated experimental data. **G.F. Ivanova** cultivated cells, substantiated the study concept, summarised and collated the study results.

Об авторах / Authors

Абзаева Наталья Вячеславовна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7418-9673>

stavnipchi@mail.ru

Кузнецова Ирина Владимировна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9513-0761>

stavnipchi@mail.ru

Гостищева Светлана Евгеньевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9891-3665>

sveta.gostisheva@yandex.ru

Жиров Андрей Михайлович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

stavnipchi@mail.ru

Ковалев Дмитрий Анатольевич, канд. хим. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

stavnipchi@mail.ru

Костроминов Артем Валерьевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2228-5038>

plagueartem@mail.ru

Фисун Алиса Анатольевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3400-9989>

stavnipchi@mail.ru

Иванова Галина Филипповна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6127-6738>

stavnipchi@mail.ru

Поступила 19.10.2022

После доработки 30.10.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Natalia V. Abzaeva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7418-9673>

stavnipchi@mail.ru

Irina V. Kuznetsova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9513-0761>

stavnipchi@mail.ru

Svetlana E. Gostischeva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9891-3665>

sveta.gostisheva@yandex.ru

Andrey M. Zhirov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

stavnipchi@mail.ru

Dmitry A. Kovalev, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

stavnipchi@mail.ru

Artem V. Kostrominov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2228-5038>

plagueartem@mail.ru

Alisa A. Fisun

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3400-9989>

stavnipchi@mail.ru

Galina F. Ivanova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6127-6738>

stavnipchi@mail.ru

Received 19 October 2022

Revised 30 October 2023

Accepted 24 November 2023