



Сравнительный анализ результатов испытаний вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» иммунофлуоресцентным и иммунохроматографическим методами

С.А. Алексеева , И.В. Касина, 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

✉ Алексеева Светлана Александровна; AlekseevaS@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Для проведения экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» актуальным представляется внедрение альтернативных методов анализа, позволяющих специфически идентифицировать споры сибиреязвенный антиген с помощью соответствующих диагностических препаратов, зарегистрированных в Российской Федерации, предназначенных для выявления спор *Bacillus anthracis*.

ЦЕЛЬ. Оценка возможности применения иммунофлуоресцентного метода и сравнительный анализ результатов его применения с иммунохроматографическим методом при испытании вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использовали коммерческие серии вакцины сибиреязвенной живой. Применяли коммерческие диагностические препараты российского производства: иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные споры адсорбированные сухие, набор реагентов: иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы (ИХ тест-система *B. anthracis*). Для приготовления мазков и проведения реакции в ИХ тест-системе готовили рабочие разведения микробных взвесей исходя из общей концентрации спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 с помощью фармакопейного стандартного образца мутности бактериальных взвесей 10 МЕ. Регистрировали качественные реакции образования иммунокомплексов.

РЕЗУЛЬТАТЫ. При испытании вакцины сибиреязвенной живой иммунофлуоресцентным методом при окраске мазков диагностическими иммуноглобулинами в разведениях 1:32 и 1:64 наблюдалась яркая зеленовато-желтая флуоресценция оболочки микробной клетки – оценка интенсивности флуоресценции на 4+ и 3+. При исследовании вакцины сибиреязвенной живой иммунохроматографическим методом выявлен споры антиген в концентрациях вакцины 10^8 и 10^9 спор/мл – зарегистрированы две отчетливые полосы темно-розового цвета, что свидетельствует о формировании иммунопреципитата. Результаты, полученные указанными методами, подтверждают принадлежность исследуемой микробной культуры к виду *B. anthracis*.

ВЫВОДЫ. Применение иммунохроматографического и иммунофлуоресцентного методов анализа с помощью соответствующих диагностических препаратов, является удобным и надежным подходом для видоспецифического выявления спор *B. anthracis* СТИ-1 в вакцине сибиреязвенной живой. Полученные результаты испытания вакцины сибиреязвенной живой по показателю качества «Подлинность» могут быть основанием для рекомендации вышеуказанных методов как альтернативных в качестве дополнения к методу бактериоскопии спор по Цилю – Нильсену, который в настоящее время применяется в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Ключевые слова: вакцина сибиреязвенная живая; иммунобиологический лекарственный препарат; показатель «Подлинность»; иммунофлуоресцентный метод; иммунохроматографический метод; диагностические препараты; иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие; ИХ тест-система; споры вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1; фармакопейный стандартный образец мутности бактериальных взвесей 10 МЕ; нормативная документация

Для цитирования: Алексеева С.А., Касина И.В., Немировская Т.И. Сравнительный анализ результатов испытаний вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» иммунофлуоресцентным и иммунохроматографическим методами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):348–356. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-348-356>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Comparative analysis of the results of live anthrax vaccine identification by immunofluorescence and immunochromatography

Svetlana A. Alekseeva ✉, Irina V. Kasina, Tatiana I. Nemirovskaya

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

✉ Svetlana A. Alekseeva; AlekseevaS@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The quality evaluation of live anthrax vaccines will benefit from the implementation of alternative testing methods that are capable of specific identification of the *Bacillus anthracis* spore antigen using the appropriate diagnostic products that are authorised in the Russian Federation for the detection of *B. anthracis* spores.

AIM. This study aimed to investigate the applicability of immunofluorescence analysis to the identification of live anthrax vaccines and compare this method with immunochromatography.

MATERIALS AND METHODS. The study used commercial batches of a live anthrax vaccine and Russian diagnostic products, including diagnostic dry adsorbed fluorescent anti-anthrax spore immunoglobulins and an immunochromatographic assay (ICA) reagent kit for rapid detection and identification of *B. anthracis* spores (ICA system for *B. anthracis*). For smears and ICA system reactions, the authors prepared working solutions of bacterial suspensions at spore concentrations typical of the *B. anthracis* СТИ-1 vaccine strain. The spore concentrations were achieved using the pharmacopoeial reference standard (RS) for the opacity of bacterial suspensions of 10 international units (IU). Identification reactions involved the registration of immune complex formation.

RESULTS. Immunofluorescence tests of the live anthrax vaccine demonstrated bright greenish-yellow envelope fluorescence with an intensity score of 3+ to 4+ for smears stained with diagnostic immunoglobulins at 1:32 and 1:64 dilutions. Immunochromatographic tests of the live anthrax vaccine detected the spore antigen at vaccine concentrations of 10^9 and 10^8 spores/mL, with the test strips showing two distinct dark-pink lines indicative of immunoprecipitation. According to the results obtained using the selected methods, the tested microbial culture was confirmed as *B. anthracis*.

CONCLUSIONS. Immunochromatography and immunofluorescence tests with appropriate diagnostic preparations are convenient and reliable tools for the species-specific detection of *B. anthracis* СТИ-1 spores in the live anthrax vaccine. The results obtained in the anthrax vaccine identification tests provide a basis for recommending the above methods as supplementary alternatives to Ziehl–Neelsen bacteriological staining, which is currently prescribed by the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Keywords: live anthrax vaccine; immunobiological medicinal product; identification; immunofluorescence analysis; immunochromatography; diagnostic products; diagnostic fluorescent immunoglobulins; immunochromatographic assay; ICA system; *B. anthracis* STI-1 vaccine strain spores; pharmacopoeial reference standard for the bacterial suspension opacity of 10 IU; regulatory standards

For citation: Alekseeva S.A., Kasina I.V., Nemirovskaya T.I. Comparative analysis of the results of live anthrax vaccine identification by immunofluorescence and immunochromatography. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):348–356. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-348-356>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Основным способом предупреждения заболевания сибирской язвой является плановая иммунизация сельскохозяйственных животных в неблагополучных районах и вакцинация лиц, подверженных повышенному риску заражения сибирской язвой. В Российской Федерации для иммунизации населения используется отечественная вакцина сибиреязвенная живая, которая представляет собой споры вакцинного сибиреязвенного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1, лиофилизированные в 10% водном растворе сахарозы. Вакцина после двукратного применения с интервалом 20–30 сут вызывает формирование специфического иммунитета продолжительностью до 1 года [1]. В Китае используют живую сибиреязвенную вакцину на основе штамма *B. anthracis* A16R. В США и Великобритании применяют химические вакцины – AVA и AVP соответственно [2].

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации¹ (ГФ РФ) обязательным показателем качества вакцины живой сибиреязвенной является показатель «Подлинность», который подтверждается при микроскопии мазков, окрашенных по Цилю – Нильсену. Однако, по мнению авторов статьи, данный метод объективно не характеризует подлинность вакцины, так как не всегда позволяет специфически идентифицировать споры сибиреязвенный антиген [3].

При проведении экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой по показателю

«Подлинность» важным аспектом является внедрение альтернативных перспективных методов анализа с помощью соответствующих диагностических препаратов, зарегистрированных в Российской Федерации, предназначенных для выявления спор возбудителя сибирской язвы. В лабораторной диагностике для обнаружения возбудителя сибирской язвы или его компонентов (ДНК, антигенов) используются разные диагностические наборы, бактериофаги и питательные среды² [4–7]. Ранее в опубликованной авторами работе при оценке качества вакцины по показателю «Подлинность» было продемонстрировано, что иммунохроматографический метод может быть эффективным экспресс-методом для видоспецифического выявления спор *B. anthracis* СТИ-1 в сибиреязвенной вакцине [3]. Кроме того, в других работах авторов рассмотрены альтернативные методы испытания вакцины сибиреязвенной и других вакцин против особо опасных инфекций (туляремийная, бруцеллезная, чумная вакцины) по показателю «Подлинность» [8–10]. Так, например, был применен иммунофлуоресцентный метод, основанный на окраске спор *B. anthracis* специфическими иммуноглобулинами, мечеными флуоресцентным красителем (реакция иммунофлуоресценции), и показана его диагностическая эффективность [8, 9]. Таким образом, внедрение альтернативных иммунологических методов для ускоренной оценки показателя «Подлинность» сибиреязвенной вакцины с помощью российских диагностических препаратов обеспечивает эффективный

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

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

² Шепелин ИА, Миронов АЮ, Шепелин КА. Возбудители особо опасных бактериальных инфекций: Справочник бактериолога. М.; 2016.

Онищенко ГГ, Кутырев ВВ, ред. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАЩ «Шико»; 2013.

контроль качества данного иммунобиологического лекарственного препарата.

Цель работы – оценка возможности применения иммунофлуоресцентного метода и сравнительный анализ результатов его применения с иммунохроматографическим методом при испытании вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность».

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- выявление спорового антигена в вакцине сибиреязвенной живой иммунофлуоресцентным методом с помощью коммерческих иммуноглобулинов диагностических сибиреязвенных при определении показателя качества «Подлинность»;
- проведение сравнительного анализа испытаний вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» иммунофлуоресцентным и иммунохроматографическим методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В исследовании использовали следующие основные материалы:

- вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения, серия 2850921, производства ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России;
- фармакопейный стандартный образец (ФСО) мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (ФСО мутности 10 МЕ) – ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) производства ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
- иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные споровые адсорбированные сухие по ТУ 9389-005-01897080-2010 (ФСР 2011/11339), серия 1-22, производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия;
- набор реагентов «Имунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы (ИХ тест-система *B. anthracis*)» по ТУ 9398-093-78095326-2008 (ФСР 2009/05485), серия О84-К-19, производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Россия.

Оборудование

Учет результатов иммунофлуоресцентного анализа проводили на микроскопе люминесцентном (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Германия).

Методы

При выполнении работ руководствовались требованиями СанПиН 3.3686-21 и методическими указаниями МУК 4.2.2413-08³.

Подтверждение подлинности вакцины сибиреязвенной живой иммунофлуоресцентным методом проводили с помощью иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных споровых адсорбированных сухих, представляющих собой меченную флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ) иммуноглобулиновую фракцию к водорастворимому антигену споровой формы *B. anthracis*, выделенную из гипериммунной кроличьей сыворотки и адсорбированную на основе магноиммосорбентов с водорастворимыми антигенами штаммов *B. cereus* 8, *B. cereus* 104, *B. cereus* 111, *B. megaterium* 6.

Препарат обеспечивает видоспецифическое выявление и идентификацию спор *B. anthracis* в суспензиях, полученных из колоний микроорганизмов, выращенных на питательном агаре в течение 7 сут при температуре 35 ± 1 °С, и в суспензиях, полученных из сырья животного происхождения и объектов окружающей среды путем специальной пробоподготовки, при которой из выращенных культур готовят микробные взвеси в 0,9% растворе натрия хлорида по ФСО мутности 10 МЕ, эквивалентной концентрации 10^8 спор/мл. Рабочее разведение иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных споровых адсорбированных сухих – 1:64. Согласно инструкции по применению рабочее разведение иммуноглобулинов должно быть не менее 1:16. В данной работе при окраске мазков с вакциной сибиреязвенной использовали разведения иммуноглобулинов 1:32 и 1:64. Поскольку вакцина сибиреязвенная живая представляет собой взвесь живых спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1, лиофилизированную в 10% водном растворе сахарозы, в связи с чем пробоподготовка исследуемого образца для получения спор не требовалась. Взвесь спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 разводили исходя из общей концентрации, указанной в паспорте на вакцину, 0,9% раствором натрия хлорида (рН $7,2 \pm 0,2$) до концентрации 10^8 спор/мл по ФСО мутности 10 МЕ и готовили мазки. Далее

³ СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4). МУК 4.2.2413-08. 4.2 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания (утв. Роспотребнадзором 29.07.2008).

проводили обеззараживание и окраску мазков, а также учет результатов в соответствии с инструкцией по применению на иммуноглобулины. Для учета результатов испытания вакцины использовалась система оценки по интенсивности свечения и количеству специфически светящихся клеток⁴: 4+ – очень яркая, сверкающая флуоресценция зеленовато-желтого цвета оболочки микробной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки; 3+ – яркая флуоресценция зеленовато-желтого цвета оболочки микробной клетки, при этом клетки расположены отдельными группами и единично; 2+ – слабое свечение всей микробной клетки; 1+ – едва заметные контуры клетки. Препарат вакцины сибиреязвенной живой в рабочем разведении должен обеспечивать специфическое зеленовато-желтое свечение интенсивностью на 3+ или 4+. Свечение на 1+ или 2+ свидетельствует об отсутствии в исследуемых мазках *B. anthracis* в споровой форме. При этом препарат вакцины в рабочем разведении не должен вызывать специфическую флуоресценцию гетерологичных штаммов рода *Bacillus*.

Испытания вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» иммунохроматографическим методом проводили, как описано ранее [3]. Для исследования готовили суспензию из взвеси спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 до концентрации 10^9 спор/мл, исходя из общей концентрации спор, указанной в паспорте на вакцину (4,9 млрд спор/мл). Затем разводили в 0,9% растворе натрия хлорида (рН 7,2±0,2) до концентрации 10^8 спор/мл по ФСО мутности 10 МЕ. Микробные взвеси в полученных разведениях в объеме 0,1 мл внесли в лунку тест-системы. Через 15 мин фиксировали результат.

Статистическая обработка данных. Испытания проводили три оператора, каждый использовал по одному образцу (ампула) вакцины сибиреязвенной живой. Так как при применении

иммунофлуоресцентного и иммунохроматографического методов регистрировали качественные реакции образования иммунокомплексов, результаты оценивали визуально, в связи с чем статистической обработки полученных результатов не проводилось.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При контроле качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Подлинность» предприятиями-изготовителями, контрольными лабораториями, экспертными организациями применяется широкий спектр методов – биологических, химических, физико-химических, молекулярных и др.⁵ В отношении препаратов вакцин против особо опасных инфекций (сибиреязвенная, туляремийная, бруцеллезная, чумная вакцины)⁶ существующие методы оценки по показателю «Подлинность» чаще всего являются достаточно трудоемкими, сложными и длительными, а также не всегда обеспечивают высокую достоверность анализа. В связи с этим для подтверждения подлинности вакцины сибиреязвенной более предпочтительным является использование иммунофлуоресцентного и иммунохроматографического методов, которые отвечают основным современным критериям, таким как экспрессность, относительная простота проведения анализа, высокая достоверность результатов анализа. Данные методы успешно применяются для экспресс-диагностики сибирской язвы как в отечественной, так и в зарубежной лабораторной практике⁷.

Результаты испытания вакцины сибиреязвенной живой иммунофлуоресцентным методом

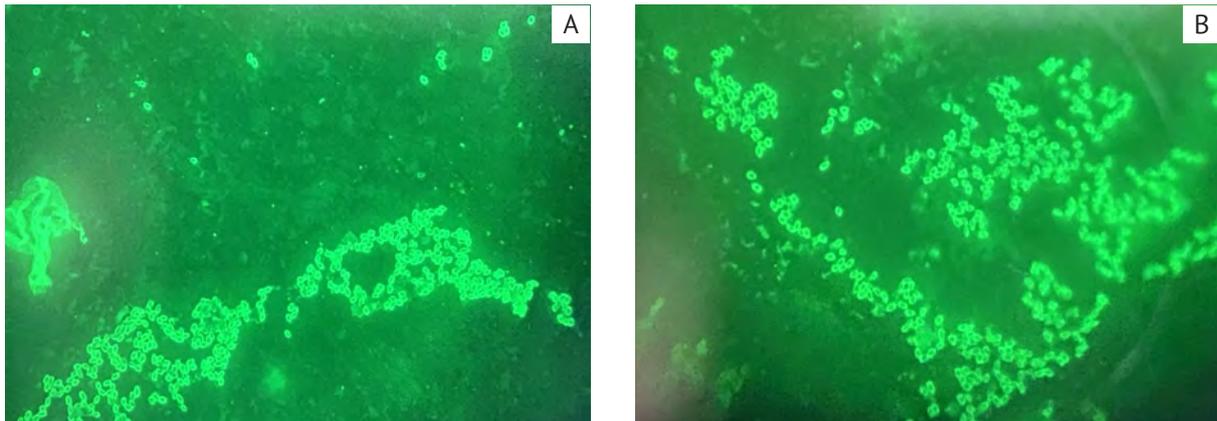
Как видно на *рисунке 1*, при окраске мазков препарата вакцины сибиреязвенной живой диагностическими иммуноглобулинами в обоих разведениях наблюдалась яркая зеленовато-желтая, сверкающая флуоресценция оболочки, четко контрастирующая с темным телом споры,

⁴ МУК 4.2.2413-08. 4.2 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания (утв. Роспотребнадзором 29.07.2008). Инструкция по применению иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных споровых адсорбированных сухих. ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора; 2011.

⁵ ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁶ ФС.3.3.1.0011.15 Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018. ФС.3.3.1.0016.15 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018. ФС.3.3.1.0019.15 Вакцина туляремийная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018. 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.

⁷ Задорина ИИ. Антигенная и молекулярно-генетическая оценка стабильности вакцинного сибиреязвенного штамма Ланге после длительного хранения: дис. ... канд. вет. наук. Казань; 2020.



Фотографии выполнены авторами/The photograph is taken by the authors

Рис. 1. Результаты испытаний вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» при окрашивании иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибиреязвенными споровыми адсорбированными. Спores *B. anthracis* СТИ-1 из препарата вакцины сибиреязвенной живой в разведении 1:32 (А) и 1:64 (В). Микроскопия, увеличение $\times 1000$.

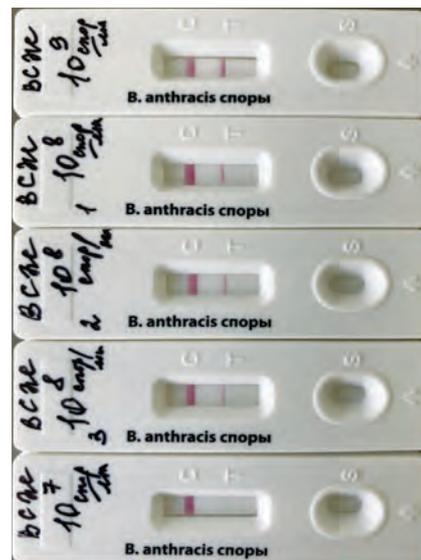
Fig. 1. Results of live anthrax vaccine identification involving staining with diagnostic adsorbed fluorescent anti-anthrax spore immunoglobulins. *B. anthracis* STI-1 spores from the vaccine at dilutions of 1:32 (A) and 1:64 (B). Microscopy, $\times 1000$ magnification.

оцениваемая на 3+ или 4+⁸. При этом были отчетливо видны окрашенные споры как в скоплениях, так и при одиночном расположении размером $(0,8-1,0) \times 1,5$ мкм². Было отмечено, что испытуемый препарат вакцины сибиреязвенной живой в рабочем разведении не вызывал специфическую флуоресценцию гетерологичных штаммов рода *Bacillus*.

На основании полученных результатов при испытании вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» рекомендовано окрашивать мазки диагностическими сибиреязвенными иммуноглобулинами в рабочем разведении.

Сравнительный анализ данных, полученных при исследовании вакцины сибиреязвенной живой иммунохроматографическим и иммунофлуоресцентным методами

При выявлении спорового антигена в вакцине сибиреязвенной живой иммунохроматографическим и иммунофлуоресцентным методами с помощью, соответственно, ИХ тест-системы *B. anthracis* и диагностических сибиреязвенных иммуноглобулинов были зафиксированы положительные результаты. В концентрациях суспензии вакцины сибиреязвенной живой, равных 10^9 и 10^8 спор/мл, в зоне «С» и «Т» тест-полосок отчетливо видны красные линии (рис. 2), которые свидетельствуют о связывании спорового антигена *B. anthracis* со специфическими антителами, иммобилизованными на тестовой линии [7].



Фотография выполнена авторами/The photograph is taken by the authors

Рис. 2. Результаты испытаний вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность», полученные с применением иммунохроматографической тест-системы для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы (ИХ тест-система *B. anthracis*).

Fig. 2. Results of live anthrax vaccine identification using immunochromatographic assay (ICA) reagent kit for rapid detection and identification of *B. anthracis* spores (ICA system for *B. anthracis*).

Примечание. Обозначения на фотографии: ВСЖ – вакцина сибиреязвенная живая; 10^9 , 10^8 , 10^7 спор/мл – концентрация микробной взвеси вакцины.

Note. The markings on the test strips for *B. anthracis* spores indicate the tested concentrations of the live anthrax vaccine (ВСЖ) bacterial suspension (10^7 , 10^8 , and 10^9 spores/mL).

⁸ МУК 4.2.2413-08. 4.2 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания (утв. Роспотребнадзором 29.07.2008).

⁹ Поздеев ОК. Медицинская микробиология. М.; 2004.

Следует отметить, что полученные авторами в данной работе положительные результаты испытаний на наличие спорового антигена *B. anthracis* иммунохроматографическим методом с помощью ИХ тест-системы коррелируют с положительными результатами других исследователей [11].

Таким образом, результаты испытания вакцины сибиреязвенной живой продемонстрировали, что как иммунофлуоресцентный, так и иммунохроматографический методы равноценны и подтверждают подлинность сибиреязвенного микроба, входящего в состав вакцины. При этом важно отметить, что каждый метод имеет как преимущества, так и недостатки (табл. 1).

Использование иммунохроматографического теста при подтверждении подлинности вакцины сибиреязвенной живой, учитывая быстроту анализа, высокую специфичность и экономичность, является удобным и надежным методом. Достоверность тестов достигает 92–99,8%, и при этом каждый тест имеет встроенный

внутренний контроль [11]. К недостаткам используемых тест-систем можно отнести субъективность оценки результатов в спорных моментах, однако это можно нивелировать путем проведения контрольных тестов¹⁰.

В свою очередь, иммунофлуоресцентный метод может быть эффективным в силу наглядного учета результатов, невысокой стоимости иммуноглобулинов диагностических сибиреязвенных спорных адсорбированных и относительно большого срока их годности (3 года). Следует отметить значительный разброс данных литературы по характеристике специфичности этого метода. Согласно данным Ю.О. Селянинова и И.Ю. Егорова [12], специфичность метода составляет 70% из-за большого числа перекрестно реагирующих антигенов с близкородственными микроорганизмами. Результаты другого исследования показывают, что иммуноглобулины диагностические сибиреязвенные в разведении 1:64 выявляют 93,8±6,0% исследуемых штаммов *B. anthracis* (оценка

Таблица 1. Сравнительная характеристика иммунохроматографического и иммунофлуоресцентного методов при оценке качества вакцины сибиреязвенной живой

Table 1. Comparative characteristics of immunochromatography and immunofluorescence analysis for the quality assessment of the live anthrax vaccine

Показатель <i>Parameter</i>	Метод <i>Method</i>	
	Иммунохроматографический <i>Immunochromatography</i>	Иммунофлуоресцентный <i>Immunofluorescence</i>
Время проведения анализа <i>Testing time</i>	15–20 мин <i>15–20 min</i>	2,5 ч <i>2.5 h</i>
Специфичность <i>Specificity</i>	92–99,8% (со встроенным внутренним контролем) <i>92–99.8% (integrated internal control)</i>	70–99%
Наглядность учета результатов <i>Visual clarity of results</i>	Визуальная оценка невооруженным глазом <i>Unaided visual inspection</i>	Визуальная оценка с помощью микроскопа <i>Microscopy</i>
Срок годности диагностических препаратов ¹¹ <i>Shelf life of diagnostic products¹¹</i>	1 год <i>1 year</i>	3 года <i>3 years</i>
Использование дополнительного оборудования <i>Additional equipment</i>	Не используется <i>not used</i>	Используется <i>used</i>
Стоимость диагностических препаратов ¹² <i>Cost of diagnostic products¹²</i>	1100 рублей за упаковку (3 теста) <i>1100 rubles per pack (3 test strips)</i>	340 рублей за ампулу <i>340 rubles per ampoule</i>

Таблица составлена авторами с использованием источников согласно сноскам^{11,12} / The table is prepared by the authors using data from the sources specified in the footnotes^{11,12}

¹⁰ Задорина ИИ. Антигенная и молекулярно-генетическая оценка стабильности вакцинного сибиреязвенного штамма Ланге после длительного хранения: дис. ... канд. вет. наук. Казань; 2020.

¹¹ Инструкция по применению иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных спорных адсорбированных сухих. ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора; 2011.

Инструкция по применению иммунохроматографической тест-системы для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы *B. anthracis* «ИХ тест-система споры *B. anthracis*». ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; 2009.

¹² <https://www.snipchi.ru/page.php?83>

<https://www.obolensk.org/services/nutrient-media/diagnostics>

по интенсивной флуоресценции на 3+ или 4+), при этом в 96,9±3,1% случаев не реагируют со штаммами близкородственных микроорганизмов¹³. Однако недостатком данного метода является использование дорогостоящего оборудования – люминесцентного микроскопа с системой светофильтров.

ВЫВОДЫ

1. Иммунофлуоресцентный метод с использованием иммуноглобулинов диагностических сибиреязвенных споровых адсорбированных является эффективным методом для видоспецифического выявления спор *B. anthracis* СТИ-1 в вакцине сибиреязвенной живой. Основные преимущества метода: наглядность учета результатов, невысокая стоимость иммуноглобулинов и относительно большой срок их годности (3 года).
2. Иммунохроматографический метод с использованием диагностического набора реагентов – иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы (ИХ тест-система *B. anthracis*) эффективен для подтверждения подлинности спорового антигена вакцины сибиреязвенной живой. Основные преимущества метода: быстрота и простота проведения анализа, специфичность и экономичность.
3. Представленные результаты испытания вакцины сибиреязвенной живой по показателю качества «Подлинность» иммунофлуоресцентным и иммунохроматографическим методами с помощью коммерческих диагностических препаратов российского производства являются основанием для рекомендации внесения данных методов в нормативную документацию на вакцину сибиреязвенную живую в качестве альтернативных подходов, дополнительных к методу бактериоскопии спор по Цилю – Нильсену.

Литература/References

1. Медуницын НВ, Катлинский АВ, Ворслов ЛО. *Вакцинология: монография*. М.: Практическая медицина. 2022. 480 с.
Medunitsyn NV, Katlinsky AV, Vorslov LO. *Vaccinology: monograph*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2022 (In Russ.).
EDN: [FOLWPT](#)
2. Микшис НИ, Попова ПЮ, Семакова АП, Кутырев ВВ. Лицензированные сибиреязвенные вакцины и экспериментальные препараты на стадии клинических исследований. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2017;(4):112–26.
Mikshis NI, Popova PYu, Semakova AP, Kutyrev VV. Licensed anthrax vaccines and experimental preparations at the stage of clinical trials. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology*. 2017;(4):112–26 (In Russ.).
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-4-112-126>
3. 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>
4. Дятлов ИА, ред. *Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы*. Оболонск: Династия; 2021.
Dyatlov IA, ed. *Methods for studying the biological and molecular genetic properties of the anthrax pathogen*. Obolensk: Dinastiya; 2021 (In Russ.).
EDN: [LBR5WQ](#)
5. Саяпина ЛВ, Лобач РН, Бондарев В., Никитюк НФ. Современное состояние лабораторной диагностики сибирской язвы: обнаружение и идентификация *Bacillus anthracis*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(1):27–34.
Sayapina LV, Lobach RN, Bondarev VP, Nikityuk NF. Current status of the laboratory diagnosis of anthrax: detection and identification of *Bacillus anthracis*. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(1):27–34 (In Russ.).
EDN: [VSCUOR](#)
6. Жарникова ИВ, Курчева СА, Русанова ДВ, Жарникова ТВ. Аналитические характеристики диагностических препаратов для иммуноанализа особо опасных инфекций. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2020;16(3):36–42.
Zharnikova IV, Kurcheva SA, Rusanova DV, Zharnikova TV. Analytical characteristics of diagnostic preparations for immunoassay of particularly dangerous infections. *Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology* 2020;16(3):36–42 (In Russ.).
EDN: [NMWSEM](#)
7. Егорова ИЮ, Селянинов ЮО, Ковалева ЕН. Оценка эффективности и практической пригодности современных методов экспресс-индикации возбудителя сибирской язвы. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016;(2):3–13.
Egorova IYu, Selyaninov YuO, Kovaleva EN. Evaluation of effectiveness and feasibility of up-to-date methods for anthrax rapid indication. *RJOAS*. 2016;(2):3–13 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18551/rjoas.2016-02.01>
8. Саяпина ЛВ, Абдрашитова АС, Лобач РН, Комратов АВ, Малахаева АН, Лешова ОЮ и др. Диагностическая эффективность иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных вегетативных адсорбированных по данным медицинских испытаний. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012;(4):92–6.
Sayapina LV, Abdrashitova AS, Lobach RN, Komratov AV, Malakhaeva AN, Leshova OYu, et al. Diagnostic efficiency

¹³ Лобач РН. Диагностическая ценность сибиреязвенных иммуноглобулинов и бактериофага гамма а-26 при выявлении и идентификации возбудителя сибирской язвы: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2014.

- of adsorbed anthrax vegetative fluorescent immunoglobulins demonstrated in the medical trials. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2012;(4):92–6 (In Russ.). EDN: [PMDKYE](#)
9. Лобач РН, Саяпина ЛВ, Абдрашитова АС, Ляшова ОЮ, Валова ТВ, Храмов МВ и др. К вопросу об индикации возбудителя сибирской язвы иммуноглобулинами флуоресцирующими сибиреязвенными спорными адсорбированными. *Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие*. 2013;8(2):46–51. Lobach RN, Sayapina LV, Abdrashitova AS, Lyashova OY, Valova TV, Khramov MV, et al. To the question of anthrax indication by fluorescing anthracis adsorbing sporous immunoglobulines. *Life without Dangers. Health. Prevention. Longevity*. 2013;8(2):46–51 (In Russ.). EDN: [QJBWOH](#)
 10. Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Оценка возможности применения иммунохроматографического метода для экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена туляремийного (Тулярина) по показателю «Подлинность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):231–40. Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. 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):231–40 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-231-240>
 11. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Шишкова НА, Герасимов ВН. *Сибиреязвенные скотомогильники: проблемы и решения*. М.: Династия; 2017. Marinin LI, Dyatlov IA, Shishkova NA, Gerasimov VN. *Anthrax cattle burials: problems and solutions*. Moscow: Dinastiya; 2017 (In Russ.). EDN: [VYYZNL](#)
 12. Селянинов ЮО, Егорова ИЮ. Об ошибках при индикации и идентификации *B. anthracis*. *Ветеринария*. 2008;(10):30–3. Selyaninov YuO, Egorova IYu. On some diagnostic mistakes as occurred at *B. anthracis* indication and identification. *Veterinary*. 2008;(10):30–3 (In Russ.). EDN: [JWCYLB](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **С.А. Алексеева** – выполнение экспериментальных исследований по определению показателя качества «Подлинность» вакцины сибиреязвенной живой, обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов, написание и критический пересмотр текста рукописи; **И.В. Касина** – формирование цели и задач исследования, выполнение экспериментальных исследований по определению показателя качества «Подлинность» вакцины сибиреязвенной живой; обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста рукописи; **Т.И. Немировская** – общее руководство, критический пересмотр текста рукописи и утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **S.A. Alekseeva** conducted identification experiments with the live plague vaccine, summarised the experimental data, analysed and interpreted the study results, and drafted and critically revised the manuscript. **I.V. Kasina** formulated the study aim and objectives, conducted identification experiments with the live plague vaccine, summarised the experimental data, analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript. **T.I. Nemirovskaya** provided general supervision of the research project, critically revised the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Алексеева Светлана Александровна, канд. биол. наук / **Svetlana A. Alekseeva**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5804-5709>

Касина Ирина Владимировна, канд. биол. наук / **Irina V. Kasina**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3287-2631>

Немировская Татьяна Ивановна, канд. мед. наук / **Tatiana I. Nemirovskaya**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0848-7306>

Поступила 10.06.2024

После доработки 12.08.2024

Принята к публикации 12.09.2024

Received 10 June 2024

Revised 12 August 2024

Accepted 12 September 2024