



Анализ современных регуляторных требований к качеству живых бактериальных вакцин и перспективы их усовершенствования

Т.И. Немировская[✉], И.В. Касина, Н.В. Александрова, С.А. Алексеева

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

✉ Немировская Татьяна Ивановна; nemirovskaya@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Живые бактериальные вакцины (ЖБВ) разработаны для профилактики туберкулеза и особо опасных инфекций: чумы, туляремии, сибирской язвы и бруцеллеза. Высокая эффективность ЖБВ связана с имитацией естественной инфекции и обеспечивает надежную и длительную защиту организма. Несмотря на значительные отличия состава и назначения живых вакцин, а также видовой принадлежности производственных штаммов, подходы к экспертизе качества этой группы лекарственных препаратов объединены рядом общих принципов. В то же время существуют значительные различия в методических подходах к оценке ряда показателей качества, некоторая часть из которых нуждается в улучшении и оптимизации.

ЦЕЛЬ. Анализ современных регуляторных требований к качеству живых бактериальных вакцин разного состава и назначения, выявление показателей качества и методов их оценки, нуждающихся в усовершенствовании, и определение перспектив разработок в данном направлении.

ОБСУЖДЕНИЕ. Нормативная документация на все ЖБВ включает общие показатели качества. Одним из основных показателей качества вакцинного препарата является его подлинность. В связи с разработкой новых отечественных диагностических тест-систем апробированы возможности их использования для подтверждения подлинности бактериальных вакцин. Для контроля качества вакцины туляреминой успешно применили иммунохроматографический и серологический методы, для бруцеллезной – серологический, для чумной и сибиреязвенной рекомендован иммунохроматографический метод. Для вакцины БЦЖ был апробирован метод мультиплексной ПЦР с использованием реактивов от отечественных производителей. Перспективным методом совершенствования экспертизы качества вакцин туберкулезной и чумной по показателю «Определение количества живых микробных клеток» и вакцины чумной по показателю «Иммуногенность» является метод проточной цитометрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Представленный анализ регуляторных требований свидетельствует о существовании проблемных вопросов, связанных с нормируемыми показателями качества ЖБВ и методами их оценки. Результаты анализа литературы и собственных исследований позволяют определить перспективные направления в методологии экспертизы качества ЖБВ, в частности использование для оценки показателя «Подлинность» коммерческих тест-систем отечественного производства.

Ключевые слова: живые бактериальные вакцины; туберкулез; чума; туляремия; сибирская язва; бруцеллез; Государственная фармакопея Российской Федерации; общая фармакопейная статья; экспертиза качества вакцины; контроль качества; оценка показателей качества

Для цитирования: Немировская Т.И., Касина И.В., Александрова Н.В., Алексеева С.А. Анализ современных регуляторных требований к качеству живых бактериальных вакцин и перспективы их усовершенствования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(4):456–466. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466>

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.

Analysis of current regulatory requirements for the quality of live bacterial vaccines and prospects for the improvement of vaccine quality control methods

Tatiana I. Nemirovskaya[✉], Irina V. Kasina, Natalia V. Aleksandrova, Svetlana A. Alekseeva

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

✉ Tatiana I. Nemirovskaya; nemirovskaya@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Currently, there are live bacterial vaccines (LBVs) for the prevention of tuberculosis and particularly dangerous infections, such as plague, tularaemia, anthrax, and brucellosis. LBVs provide reliable and long-lasting protection. The high effectiveness of LBVs is due to their ability to mimic natural infections. Despite significant differences in LBV compositions, indications, and production species, the applicable quality control approaches share some common principles. At the same time, there are significant differences in methodological approaches to the assessment of a number of quality attributes, and some of these approaches require improvement and/or optimisation.

AIM. This study aimed to analyse current regulatory requirements for the quality of LBVs having different compositions and indications, to identify the quality attributes of LBVs with the associated quality control methods in need of improvement, and to explore promising pathways for further development in this area.

DISCUSSION. The review of regulatory standards and manufacturer specifications identified several quality attributes common to all LBVs. Vaccine identity was considered a key quality attribute. Motivated by the development of novel national diagnostic test systems, the authors analysed the performance of these test systems in practice to determine their potential for the identification of bacterial vaccines. In particular, immunochromatographic and serological techniques were successfully applied to the quality control of the tularaemia vaccine, a serological method was deemed suitable for brucellosis vaccines, and immunochromatography was recommended for plague and anthrax vaccines. A multiplex PCR method passed practical testing to be used for the quality control of BCG vaccines with reagents from Russian manufacturers. Flow cytometry was considered a promising technique for improving the quality control of LBVs in terms of viable units (tuberculosis and plague vaccines) and immunogenicity (plague vaccines).

CONCLUSIONS. This analysis of regulatory requirements highlighted problematic issues related to the standardised quality attributes of LBVs and methods for their assessment. The literature review results and the authors' own data indicate promising directions for improving the methodology of LBV quality assessment. One of these promising directions is the use of Russian-made commercial test systems for LBV identification.

Keywords:

live bacterial vaccines; tuberculosis; plague; tularaemia; anthrax; brucellosis; State Pharmacopoeia of the Russian Federation; general pharmacopoeial chapter; vaccine quality assessment; quality control; assessment of quality attributes

For citation:

Nemirovskaya T.I., Kasina I.V., Aleksandrova N.V., Alekseeva S.A. Analysis of current regulatory requirements for the quality of live bacterial vaccines and prospects for the improvement of vaccine quality control methods. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):456–466. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466>

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

В связи с состоянием специфического антигена бактериальные вакцины подразделяют на живые и инактивированные. Живые вакцины должны содержать штаммы со стойко сниженной вирулентностью, но сохранившими свои иммуногенные свойства. При производстве бактериальных вакцин используют штаммы, обладающие типичными для своего вида культурально-морфологическими, тинкториальными (способность вступать в реакцию с красителями), биохимическими, серологическими свойствами, чувствительностью к специфическому бактериофагу, а также штаммы, стабильно утратившие гены патогенности и не способные реверсировать в вирулентное состояние. Штаммы не должны вызывать заболевание у людей и лабораторных животных, то есть быть специфически безопасными, но при этом сохранять остаточную вирулентность для лабораторных животных. Штаммы должны обеспечивать способность адаптироваться в организме и вызывать иммунобиологическую перестройку (выработку антител). Основным свойством вакцинных штаммов является иммуногенность, определяемая в тесте активной защиты лабораторных животных против летального действия вирулентного штамма [1, 2].

Живые бактериальные вакцины (ЖБВ) разрабатывают для профилактики туберкулеза (вакцина

туберкулезная (БЦЖ) живая, вакцина туберкулезная для щадящей первичной иммунизации (БЦЖ-М)) и особо опасных инфекций (ООИ): чумы, туляремии, сибирской язвы и бруцеллеза¹. Эпидемиологическая обстановка по данным инфекциям в Российской Федерации остается напряженной. В отличие от большинства зарубежных стран, в Российской Федерации вакцинация против туберкулеза включена в Национальный календарь профилактических прививок в качестве обязательной. Вакцинация против ООИ осуществляется исключительно по эпидемическим показаниям. Качество отечественных туберкулезных вакцин соответствует рекомендациям ВОЗ и требованиям Европейской фармакопеи (ЕФ). К качеству вакцин против ООИ такие требования отсутствуют [3–5]. Аналогов живых вакцин против ООИ в США и европейских странах не существует. Выпуск в гражданский оборот ЖБВ осуществляется в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации² (ГФ РФ) и нормативной документации (НД)³.

Работа по усовершенствованию экспертизы качества ЖБВ и внедрению современных и точных методов на различных уровнях постоянно ведется разными исследователями. В настоящей работе представлен обзорный материал по результатам многолетнего опыта (2016–2024 гг.)

¹ 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.; 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.; 2018.
ФС.3.3.1.0018.15 Вакцина туберкулезная БЦЖ живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.; 2016.
ФС.3.3.1.0019.15 Вакцина туляремиальная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 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.; 2018.
СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней.

² ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

³ НД Р N003612/01-120521 Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения.
НД ЛСР-005759/08-231120 Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций.
НД Р N002348/01-111021 Вакцина туляремиальная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения.
НД Р N001273/01-161019 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения.
НД Р N001969/01-040418 Вакцина туберкулезная (БЦЖ), лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения.

исследований в этом направлении, включая работы, проведенные в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Цель работы — анализ современных регуляторных требований к качеству живых бактериальных вакцин разного состава и назначения, выявление показателей качества и методов их оценки, нуждающихся в усовершенствовании, и определение перспектив разработок в данном направлении.

Анализ регуляторных требований к качеству ЖБВ свидетельствует о существовании проблемных вопросов, связанных с показателями качества и методами их оценки, регламентированными нормативной документацией, а также определяет перспективы разработок в данном направлении, в том числе с использованием коммерческих тест-систем отечественного производства. Это будет способствовать расширению спектра методов контроля вакцинных препаратов в условиях отсутствия необходимых реагентов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В соответствии с ОФС «Вакцины и анатоксины» ГФ РФ⁴ на все ЖБВ имеются общие показатели качества: «Описание», «Время растворения или восстановления препарата», «Потеря в массе при высушивании», «Отсутствие посторонних бактерий и грибов», «Термостабильность» и др. (табл. 1) (опубликована на сайте журнала⁵). Основными показателями качества являются «Подлинность», «Специфическая активность. Общая концентрация микробных клеток», «Специфическая активность. Количество живых микробных клеток», «Специфическая активность. Количество прививочных доз», «Специфическая активность. Иммуногенность», «Специфическая безопасность». Ввиду особенностей производства ЖБВ имеют место определенные различия в составе спецификаций (табл. 2) (опубликована на сайте журнала⁶).

Так, качество препаратов по показателю «Средняя масса и однородность по массе» оценивают только для живых вакцин против ООИ. Для вакцины БЦЖ данный показатель отсутствует, так как масса препарата в ампуле недостаточна для проведения данного испытания. Туберкулезная вакцина имеет относительно небольшую общую концентрацию бактерий

(10–20 млн микробных клеток в 1 мг лиофилизата вакцины). Общее содержание микробных клеток определяют спектрофотометрическим методом по показателю оптической плотности. Данный показатель в вакцине отражает массу и однородность бактериальной суспензии.

Для оценки бактериальных суспензий живых вакцин против ООИ дополнительно применяют показатели «Седиментационная устойчивость», «Проходимость через иглу» и «рН».

В отличие от других бактериальных вакцин, вакцина туляремиальная имеет дополнительные показатели качества, такие как «Степень диссоциации» и «Прививаемость». Выросшие колонии вакцинного штамма туляремиального микроба оценивают по степени диссоциации. Число иммуногенных колоний SR-типа белого цвета (круглые, гладкие, выпуклые колонии с ровными краями и блестящей поверхностью) должно быть не менее 80% от общего числа выросших колоний. Прививаемость оценивают по выраженности гиперемии и инфильтрата на кожном покрове в месте нанесения вакцины.

Оценка показателей качества вакцинных препаратов

Показатель качества «Подлинность»

В соответствии с ОФС.1.7.1.0018.18 «Иммунобиологические лекарственные препараты» ГФ РФ⁷ подлинность может подтверждаться различными лабораторными методами (биологическими, иммунобиологическими, молекулярными, химическими и физико-химическими), позволяющими специфически идентифицировать лекарственный препарат. В соответствии с требованиями НД подлинность вакцин туляремиальной, бруцеллезной и чумной определяется иммунофлуоресцентным методом с помощью диагностических коммерческих препаратов — специфических флуоресцирующих иммуноглобулинов. Из-за временного отсутствия на отечественном рынке диагностических иммуноглобулинов может возникнуть дефектура вышеуказанных лекарственных препаратов. Поэтому необходимо внесение в НД альтернативных и/или дополнительных методов испытаний вакцин по показателю «Подлинность».

В вакцинах сибиреязвенной и туберкулезной подлинность подтверждается посредством микроскопии мазков из препарата, окрашенных

⁴ ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

⁵ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466-table1>

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466-table2>

⁷ ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

по методу Циля — Нильсена для выявления кислотоустойчивых бактерий. В вакцине сибиреязвенной живой подлинность подтверждается методом, основанным на различиях в устойчивости к красителям структурно-функционально полноценных (потенциально живых) и дефектных спор. Данный метод объективно не подтверждает подлинность сибиреязвенной вакцины, так как не позволяет специфически идентифицировать споровый сибиреязвенный антиген. Контроль качества вакцины БЦЖ по показателю «Подлинность» заключается в исследовании мазков, окрашенных на кислотоустойчивость по методу Циля — Нильсена, и по визуальному анализу характера колоний микроорганизма на среде Левенштейна — Йенсена. Согласно рекомендациям ВОЗ⁸ каждая посевная и коммерческая серия вакцины БЦЖ должна быть испытана молекулярно-биологическим методом на подлинность, то есть на соответствие именно тому штамму, который указан в НД на препарат.

В ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России с целью поиска альтернативных методов испытания вакцин против ООИ по показателю «Подлинность» был предложен и апробирован ряд возможных методов для подтверждения подлинности вакцин с помощью соответствующих диагностических препаратов от отечественных производителей. Предложенные коммерческие диагностические наборы и тест-системы подтверждают видовую принадлежность производственного вакцинного штамма в вакцине. В предыдущих работах авторов проведены исследования, показавшие успешное применение методов при контроле качества вакцины туляреминой иммунохроматографического и серологического метода, для бруцеллезной вакцины — серологического метода, для чумной вакцины — иммунохроматографического метода. При выявлении специфического антигена (липолисахарид *Francisella tularensis* и капсульный антиген F1 *Yersinia pestis*) вакцин туляреминой и чумной иммунохроматографическим методом были зафиксированы положительные результаты в концентрации вакцин 1×10^8 – 1×10^9 м.к./мл. В развернутой реакции агглютинации в рабочих разведениях 1:3200 или 1:800 сыворотки диагностической туляреминой или бруцеллезной соответственно наблюдалась агглютинация вакцин при легкой опалесценции надосадочной жидкости на +++ (по 4-крестовой системе оценки) [6–8].

Для контроля качества вакцины сибиреязвенной по показателю «Подлинность» успешно

апробированы иммунохроматографический и иммунофлуоресцентный методы с помощью отечественных коммерческих диагностических препаратов, выявляющие споры *Bacillus anthracis*. При выявлении специфического спорового антигена *B. anthracis* иммунохроматографическим методом были зафиксированы положительные результаты в концентрации вакцины 1×10^7 – 1×10^9 м.к./мл. При выявлении иммунофлуоресцентным методом в мазках вакцины, окрашенных иммуноглобулинами флуоресцирующими сибиреязвенными споровыми в рабочем разведении не менее 1:16, наблюдалась очень яркая, сверкающая флуоресценция оболочки зеленовато-желтого цвета, четко контрастирующая с темным телом споры на +++/++++ (система оценки по интенсивности свечения и количеству специфически светящихся клеток) [9].

Вышеуказанные методы могут быть рекомендованы для внесения их в НД для испытания вакцин против ООИ по показателю «Подлинность» в качестве дополнительных или альтернативных.

Для оценки показателя «Подлинность» вакцины БЦЖ апробировали метод мультиплексной ПЦР (мПЦР) с помощью реактивов от отечественных производителей. Метод мПЦР был использован авторами в международных коллаборативных испытаниях при оценке референс-субштаммов БЦЖ. В дальнейшем образцы отечественных серий посевного материала оценили при помощи мПЦР с такими же специфическими праймерами, которые указаны в руководствах ВОЗ. Показано, что метод мПЦР был адекватен и воспроизводим, при этом анализ полученных данных подтвердил стабильность посевных серий в процессе производства вакцины БЦЖ, а также коммерческих серий при их выпуске [10].

Исследования в данном направлении, в том числе и по применению других наборов для ПЦР, могут быть продолжены.

Показатель качества «Отсутствие посторонних бактерий и грибов» является одним из основных и общих показателей качества ЖБВ. Живые вакцины должны содержать только чистую культуру производственного вакцинного штамма, лиофилизированную в стабилизирующей среде. Испытание проводят в соответствии требованиями ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» ГФ РФ⁹ методом прямого посева с использованием только тиогликолевой среды [3]. Пересев осуществляют на 5–7 сут. При посеве вакцины туляреминой размножение туляреминого микроба

⁸ WHO Technical Report Series № 977, 60 report, 16–18. WHO; 2013.

⁹ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

в тиогликолевой среде происходит медленно; по поверхности среды образуется зона облако-видных образований и слабой опалесценции, что связано с аэрофильностью бактерий, поэтому специфические признаки роста микробных клеток в первичном посеве и пересеве сохраняются. Многочисленные испытания туляреминой вакцины, проведенные в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, показали, что, учитывая характер роста туляреминого микроба, возможно внесение изменений в методику проведения испытания путем исключения стадии пересева. Однако данное усовершенствование неприемлемо для испытания других вакцин против ООИ и туберкулезной вакцины [11].

Показатель качества

«Специфическая активность.

Общая концентрация микробных клеток»

Показатель «Специфическая активность» в ЖБВ против ООИ обусловлен общей концентрацией микробных клеток и количеством живых микробных клеток. Все методики подсчета общей концентрации бактерий изложены в ОФС.1.7.2.0008.15 «Определение концентрации микробных клеток» ГФ РФ¹⁰. Живые вакцины против ООИ содержат значительную концентрацию бактерий (1×10^{10} – 10×10^{10} м.к./мл). В вакцинах туляреминой, чумной и бруцеллезной общая концентрация микробных клеток (живые и неживые клетки) определяется визуально по ФСО 42-28-85П (ФСО – фармакопейный стандартный образец) мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (ФСО мутности 10 МЕ) и затем рассчитывается по формуле с использованием коэффициента концентрации для соответствующего микроба, указанного в инструкции по применению¹¹. В вакцине сибиреязвенной количество прививочных доз рассчитывается по формуле¹² исходя из общей концентрации спор, которую определяют в камере Горяева.

Проведенные в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России исследовательские работы указали на возможность подсчета общей концентрации спор в вакцине сибиреязвенной живой по ФСО мутности 10 МЕ, так как соответствующий эквивалент концентрации спор с недавнего времени указан в инструкции по применению. Установлено, что определение общей концентра-

ции спор по ФСО мутности 10 МЕ более объективно и информативно, так как споры могут слипаться и их подсчет в камере Горяева затруднен. Данный способ подсчета общей концентрации спор в вакцине сибиреязвенной живой может быть рекомендован для внесения в НД.

В процессе проведения испытания вакцины бруцеллезной живой в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России выявлено несоответствие коэффициента концентрации бруцелл по ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ фактическим данным $1,7 \times 10^9$ м.к./мл. Анализ результатов испытаний вакцины на производстве и в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России показал, что полученное при посеве количество живых микробных клеток в образцах вакцины достигало 100% или значительно превышало общую концентрацию, определенную по ФСО мутности 10 МЕ. Такие результаты противоречат как математическим, так и биологическим принципам. Экспериментально установлено, что концентрация бруцеллезного микроба по ФСО мутности 10 МЕ соответствует $3,0 \times 10^9$ м.к./мл [12].

Возможно, оптимальным решением при испытании готовых вакцин бруцеллезной, чумной и туляреминой был бы отказ от определения общей концентрации микробных клеток по ФСО мутности и только определение жизнеспособных микробных клеток методом прямого посева на питательные среды. Исходя из фактического количества живых микробных клеток в вакцинах чумной, бруцеллезной и туляреминой, определяют количество прививочных доз в ампуле и с учетом этих данных иммунизируют лабораторных животных при испытании по показателю «Иммуногенность».

Показатель качества

«Специфическая активность.

Количество живых микробных клеток»

«Золотым стандартом» для оценки специфической активности ЖБВ является микробиологический метод посева на специальные плотные питательные среды. По количеству выросших колоний (число колониеобразующих единиц, КОЕ) рассчитывают показатель жизнеспособных микробных клеток в вакцине и число прививочных доз в ампуле. Количество жизнеспособных клеток в живых вакцинах против ООИ должно составлять

¹⁰ ОФС.1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

¹¹ Инструкция по применению ФСО Государственной фармакопеи Российской Федерации. Стандартный образец мутности бактериальных взвесей ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) (10 МЕ), ФСО 3.1.00086 (ОСО 42-28-86) (5 МЕ).

¹² ОФС.1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 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.; 2018.

от 25 до 60% от общей концентрации клеток. Методика проведения испытания жизнеспособности клеток в вакцинах против ООИ подразумевает использование больших объемов аналитических проб (десятикратные разведения 0,5 мл вакцины в 4,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида). В дальнейшем планируется усовершенствование методики определения количества живых микробных клеток в бруцеллезной, чумной и туляреминой вакцинах с использованием малых объемов аналитических проб. Предлагаемые изменения методики обеспечат экономичность расхода реагентов, а точные разведения вакцины можно достигнуть с помощью поверенных дозаторов.

В туберкулезных вакцинах количество живых микробных клеток оценивается ≈ 1 млн на 1 мг лифилизата вакцины. Метод прямого посева трудоемкий и времязатратный – учет результатов посева возможен не раньше, чем через 26–30 сут после начала испытания. Особенности морфологических характеристик микобактерий, в частности строение клеточной стенки и ее липидный состав [13, 14], обуславливают образование агрегатов из 5 до 20 и более клеток в восстановленной (после добавления растворителя) вакцине, что может затруднить учет результатов испытания. На смену методу прямого посева может прийти метод проточной цитометрии, который позволит получать информацию о метаболическом статусе популяции бактерий в процессе роста и на отдельных стадиях всей технологической цепочки [15–17]. Использование метода проточной цитометрии может быть перспективным направлением для стандартизации производства и контроля качества туберкулезных вакцин БЦЖ.

В литературе также представлены данные об успешном применении метода проточной цитометрии для определения количества живых микробных клеток в оценке качества вакцины чумной живой. Так, Н.В. Абзаева и соавт. показали, что результаты контроля качества данного препарата, полученные бактериологическим методом и методом проточной цитометрии, не имели достоверных различий и характеризовались высоким коэффициентом детерминации ($R^2=0,99$) [18]. Благодаря высокой информативности, скорости и простоте выполнения анализа метод проточной цитометрии является более предпочтительным и перспективным для других живых бактериальных вакцин в сравнении с традиционными методами анализа.

Показатель качества «Термостабильность»

ЖБВ дополнительно оценивают по показателю «Термостабильность». В вакцинах бруцеллезной,

чумной и туляреминой этот показатель определяется сроком, в течение которого в препарате сохраняется 50% живых микробных клеток по отношению к первоначальному количеству после хранения вакцин при температуре 37 ± 1 °C в течение регламентированного НД отрезка времени. Вакцину сибиреязвенную по данному показателю качества не оценивают, так как споры более устойчивы к неблагоприятным условиям окружающей среды. В соответствии с НД в определенном отрезке времени допускается транспортировка вакцины сибиреязвенной без соблюдения «холодовой цепи». Вакцину для профилактики туберкулеза считают прошедшей испытание, если при хранении в течение 28 сут при температуре 37 ± 1 °C число жизнеспособных микробных клеток составляет не менее 20% от их исходного числа. Вакцины против ООИ соответствуют требованиям НД, если значение показателя «Термостабильность», рассчитанное в сутках, составляет ≥ 4 сут (вакцина чумная) и ≥ 7 сут (вакцины туляреминая и бруцеллезная). Данный показатель в вакцинах туберкулезных оценивают в каждой пятой выпущенной серии; в вакцинах чумной, туляреминой и бруцеллезной – в каждой серии. В настоящее время при хранении и транспортировке лекарственных препаратов четко соблюдается «холодовая цепь». Поэтому считаем, что по показателю «Термостабильность» может быть испытана не каждая серия вакцины чумной, туляреминой и бруцеллезной.

Показатели качества живых бактериальных вакцин, определяемые биологическими методами

Показатель качества

«Специфическая безопасность»

Специфическую безопасность ЖБВ подтверждают на моделях разных видов лабораторных животных, адекватно отвечающих на соответствующие инфекции: бруцеллезную вакцину исследуют на белых мышах; сибиреязвенную – на кроликах; чумную, туляреминую и туберкулезную вакцины – на морских свинках. Животным вводят несколько прививочных доз, исходя из рекомендованных для человека, и оценивают их выживаемость, токсическое действие на организм, возникновение местных и общих реакций организма в течение срока наблюдения, отсутствие специфических признаков соответствующих инфекций. Например, при оценке качества вакцин туберкулезной и туляреминой допускается гибель одной опытной морской свинки из трех (вакцина туляреминая) и одной из шести (вакцина туберкулезная).

При контроле других вакцин гибель животных исключена, но возможны проявления некоторых нежелательных общих и местных реакций, таких как снижение массы тела и некроз в месте введения. При контроле вакцины чумной после вскрытия морской свинки недопустимо выделение вакцинного штамма из легкого и крови, но допустимо его обнаружение в биоматериале из места введения и регионарного лимфоузла. При оценке специфической безвредности туберкулезной вакцины при вскрытии животных через 6 нед. после введения вакцинного препарата не допускается наличие признаков туберкулезной инфекции, что должно свидетельствовать об отсутствии вирулентных микробактерий. Испытания вакцин сибиреязвенной и туберкулезной по этому показателю являются приемлемыми и не требуют никаких изменений. В дальнейшем для вакцин туляремийной, бруцеллезной и чумной предполагается проведение исследований по изменению дозы для введения животным, рассчитанной не из величины общей концентрации, а исходя из количества живых микробных клеток и количества прививочных доз для человека.

В НД на вакцину туберкулезную указан дополнительный показатель качества «Аномальная токсичность», который оценивают в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность» Государственной фармакопеи Российской Федерации¹³ по стандартной методике. Данный показатель отсутствует в НД на живые вакцины против ООИ, так как вакцинные штаммы обладают остаточной вирулентностью для лабораторных животных, соответственно допускается определенный процент их гибели.

Показатель качества «Иммуногенность»

Основным показателем качества профилактических вакцин является их иммуногенная активность, определяемая в тесте активной защиты лабораторных животных против летального воздействия вирулентного штамма. При испытании вакцин чумной, туляремийной и бруцеллезной лабораторных животных иммунизируют определенными дозами живых микробных клеток, содержащихся в препарате. В сибиреязвенной вакцине животных иммунизируют одной подкожной прививочной дозой исходя из общей концентрации спор.

Иммуногенность живых вакцин против ООИ определяют несколькими способами:

- в чумной вакцине — по расчету эффективной дозы ED_{50} (50% effective dose) живых микробных клеток вакцинного штамма, которая обеспечивает 50% выживаемость лабораторных животных после заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 200 Dcl (dosis certa letalis — заведомо смертельная доза);
- в сибиреязвенной вакцине — по индексу иммунитета (значение индекса должно быть не менее 10000¹⁴);
- в туляремийной вакцине — в тесте активной защиты; не менее 8 из 10 морских свинок, привитых накожно, должны быть защищены от гибели после заражения 1000 Dcl вирулентным штаммом туляремийного микроба гомарктической расы, 1 Dcl которого не должен превышать 5 м.к.

При контроле иммуногенности бруцеллезной вакцины среди иммунизированных морских свинок определяют процент инфицирования вирулентным штаммом, так как данная инфекция для них не является летальной. Животных после регламентированных сроков наблюдения подвергают эвтаназии и далее выполняют соответствующие патоморфологические исследования. В опыте с бруцеллезной вакциной делают бактериологические посевы биоматериала лимфатических узлов, печени и селезенки на предмет отсутствия роста вирулентного штамма *B. melitensis*.

Показатель качества «Иммуногенность» в НД на туберкулезную вакцину отсутствует. В ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по этому показателю исследуется только туберкулезный производственный вакцинный штамм.

Испытание вакцин против ООИ по показателю «Иммуногенность» каждой выпущенной серии не проводится. При производстве вакцин чумной и сибиреязвенной предусмотрен контроль каждой пятой серии по этому показателю; вакцин туляремийной и бруцеллезной — одной серии, из числа выпущенных в первом и втором полугодии.

В настоящее время разрабатывают перспективные подходы к оценке качества вакцины чумной по показателю «Иммуногенность». Показана возможность применения антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* и технологии цитометрического анализа [8]. В результате исследования обнаружено, что у экспериментальных животных (белые мыши), вакцинированных живыми микробными клетками в дозах 4×10^3 – 1×10^6 , наивысший уровень экспрессии

¹³ ОФС.1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

¹⁴ Индекс иммунитета — отношение величины LD_{50} заражающего тест-штамма *B. anthracis* 71/12 для иммунизированных животных к величине LD_{50} для неиммунизированных (контрольных) животных (морских свинок). ФС.3.3.1.0016.15 Вакцина сибиреязвенная живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.; 2016.

лимфоцитами маркера ранней активации (CD25) при антигенной стимуляции *in vitro* регистрируется на 14 сут после иммунизации; при этом количество CD25⁺ лимфоцитов в среднем в 6,8 раза выше, чем в контрольной группе животных. Установлена высокая корреляция между количеством выживших животных и увеличением количества CD25⁺ лимфоцитов. Исследования в этом направлении могут быть перспективными и для других вакцин. В данных испытаниях не проводится заражение лабораторных животных вирулентными штаммами микроорганизмов I–II групп патогенности, что свидетельствует о гуманном отношении к животным, сокращении сроков проведения испытания и исключения биологической опасности.

Впервые проведенный сравнительный анализ регуляторных требований к качеству ЖБВ разного состава и назначения свидетельствует о наличии как ряда общих принципов оценки

качества вакцинных препаратов, так и о существовании проблемных вопросов, связанных с необходимостью усовершенствования показателей качества и методов их контроля. Результаты анализа литературы и собственных исследований позволяют определить перспективные направления в методологии экспертизы качества ЖБВ (табл. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что живые бактериальные вакцины (ЖБВ) существуют давно и относятся к вакцинам первого поколения, они обладают рядом несомненных преимуществ. В первую очередь это высокая эффективность, обусловленная имитацией естественной инфекции, что важно для создания надежной и длительной защиты организма. Для формирования надежного иммунитета часто достаточно однократного введения вакцины. Пути введения ЖБВ

Таблица 3. Перспективные или альтернативные методы испытания живых бактериальных вакцин
Table 3. Promising and/or orthogonal methods for testing live bacterial vaccines

Наименование вакцины <i>Vaccine name</i>	Показатель качества <i>Quality attribute</i>	Метод испытания <i>Test method</i>
Вакцина чумная живая <i>Live plague vaccine</i>	Подлинность <i>Identification</i>	Иммунохроматографический метод [7] <i>Immunochromatography [7]</i>
	Специфическая активность. Количество живых микробных клеток <i>Potency: count of viable units</i>	Проточная цитометрия [18] <i>Flow cytometry [18]</i>
	Специфическая активность. Иммуногенность <i>Potency: immunogenicity</i>	Проточная цитометрия [8] <i>Flow cytometry [8]</i>
Вакцина туляремия живая <i>Live tularaemia vaccine</i>	Подлинность <i>Identification</i>	Иммунохроматографический <i>Immunochromatography</i> Серологический метод (реакция агглютинации) [6] <i>Serological assay (agglutination reaction) [6]</i>
Вакцина сибиреязвенная живая <i>Live anthrax vaccine</i>	Подлинность <i>Identification</i>	Иммунохроматографический метод Иммунофлуоресцентный метод [9] <i>Immunochromatography</i> <i>Immunofluorescence test [9]</i>
	Специфическая активность. Концентрация микробных клеток <i>Potency: microbial cell concentration</i>	Визуальный по ФСО мутности 10 МЕ и расчету по формуле <i>Visual inspection using 10 IU pharmacopoeia standard for bacterial suspension turbidity and formula-based calculation</i>
Вакцина бруцеллезная живая <i>Live brucellosis vaccine</i>	Подлинность <i>Identification</i>	Серологический метод (реакция агглютинации) [6] <i>Serological assay (agglutination reaction) [6]</i>
Вакцина туберкулезная БЦЖ <i>Tuberculosis vaccine (BCG)</i>	Подлинность <i>Identification</i>	Мультиплексная ПЦР [10] <i>Multiplex PCR [10]</i>
	Специфическая активность. Количество живых микробных клеток <i>Potency: count of viable units</i>	Проточная цитометрия [15–17] <i>Flow cytometry [15–17]</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание: ФСО – фармакопейный стандартный образец; ПЦР – полимеразно-цепная реакция; МЕ – международные единицы.
Note: PCR, polymerase chain reaction; IU, international units.

могут быть достаточно простыми, например скарификационный, ингаляционный или подкожный путь.

На основании проведенного анализа можно сделать заключение о целесообразности и необходимости внесения в регуляторные тре-

бования современных методов экспертизы ЖБВ в качестве альтернативных и/или дополнительных, что позволит избежать дефектуры из-за отсутствия необходимых реагентов и расширить возможности выбора метода контроля на производстве и в экспертной организации.

Литература/References

1. Медуницын НВ, Катлинский АВ, Ворслов ЛО. *Вакцинология: монография*. М.: Практическая медицина; 2022. Medunitsyn NV, Katlinsky AV, Vorslov LO. *Vaccinology: monograph*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2022 (In Russ.). EDN: [FOLWPT](#)
2. Дятлов ИА. Современные технологические платформы для разработки вакцин против опасных бактериальных инфекций (часть II). *Бактериология*. 2022;7(4):5–9. Dyatlov IA. Modern technological platforms for the development of vaccines against dangerous bacterial infections (part II). *Bacteriology*. 2022;7(4):5–9 (In Russ.). EDN: [DNAHCO](#)
3. Саяпина ЛВ, Бондарев ВП, Олефир ЮВ. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(2):107–10. Sayapina LV, Bondarev VP, Olefir YuV. Current state of vaccine prophylaxis of particularly dangerous infections. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(2):107–10 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-107-110>
4. Щипелева ИА, Кретенчук ОФ, Коршенко ВА, Марковская ЕИ. Современное состояние и перспективы специфической профилактики чумы. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2022;12(1):101–9. Shchipeleva IA, Kretenchuk OF, Korshenko VA, Markovskaya EI. Current status and prospects for specific plague prevention. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2022;12(1):101–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.18565/epidem.2022.12.1.101-9>
5. Сычева АА, Алгазина ВВ, Полякова АС. Вакцина БЦЖ и новые противотуберкулезные вакцины. *Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза*. 2021;(S1):27–8. Sycheva AA, Algazina BB, Polyakova AS. BCG vaccine and new tuberculosis vaccines. *CTRI Bulletin*. 2021;(S1):27–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.7868/S2587667821050095>
6. Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Применение альтернативных методов оценки качества вакцины туляремии живой и вакцины бруцеллезной живой по показателю «Подлинность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):61–75. Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. Application of alternative identification methods for live tularemia and brucellosis vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):61–75 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-61-75>
7. Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Оценка возможности применения иммунохроматографического метода для экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена туляремии (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 tularemia 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>
8. Гостищева СЕ, Абзаева НВ, Ракитина ЕЛ, Пономаренко ДГ, Костюченко МВ, Логвиненко ОВ, Куличенко АН. Перспективный подход к оценке качества вакцины чумной живой по показателю иммуногенности. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019;18(1):50–4. Gostischeva SE, Abzaeva NV, Rakitina EL, Ponomarenko DG, Kostuchenko MV, Logvinenko OV, Kulichenko AN. Perspectives approach to the assessment of the quality of the vaccine plague live in terms of immunogenicity. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2019;18(1):50–4 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-1-50-54>
9. Алексеева СА, Касина ИВ, Немировская ТИ. Сравнительный анализ результатов испытаний вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» иммунофлуоресцентным и иммунохроматографическим методами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):348–56. Alekseeva SA, Kasina IV, Nemirovskaya TI. Comparative analysis of the results of live anthrax vaccine identification by immunofluorescence and immunochromatography. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):348–56 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-348-356>
10. Леви ДТ, Обухов ЮИ, Александрова НВ, Волкова РА, Эльберт ЕВ, Альварес Фигероа МВ и др. Оценка подлинности и стабильности вакцины БЦЖ методом мультиплексной ПЦР. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(1):49–54. Levi DT, Obukhov Yul, Aleksandrova NV, Volkova RA, Elbert EV, Alvarez Figueroa MV, et al. Identity and stability assessment of BCG vaccine by multiplex PCR. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(1):49–54 (In Russ.). EDN: [VSCURV](#)
11. Суханова СМ, Саяпина ЛВ, Бердникова ЗЕ, Тихонова АС, Климов ВИ. Проблемы оценки «стерильности» живых бактериальных вакцин. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(3):87–93. Sukhanova SM, Sayapina LV, Berdnikova ZE, Tikhonova AS, Klimov VI. Problems of assessment of live bacterial vaccine sterility. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(3):87–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-3-87-93>
12. Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины бруцеллезной живой по показателю «Специфическая активность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):126–35. Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. Prospects for improving quality evaluation of the live brucellosis vaccine in terms of specific activity. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):126–35 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-126-135>
13. Guallar-Garrido S, Almiñana-Rapún F, Campo-Pérez V, Torrents E, Luquin M, Julián E. BCG substrains change their outermost surface as a function of growth media. *Vaccines (Basel)*. 2021;10(1):40. <https://doi.org/10.3390/vaccines10010040>
14. Prados-Rosales R, Carreño LJ, Weinrick B, Batista-Gonzalez A, Glatman-Freedman A, Xu J, et al. The type of growth medium affects the presence of a mycobacterium capsule and is associated with differences in protective efficacy of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 2016;214(3):426–37. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw153>

15. Pascoe J, Hendon-Dunn CL, Birch CPD, Williams GA, Chambers MA, Bacon J. Optimisation of *Mycobacterium bovis* BCG fermentation and storage survival. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):900.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090900>
16. 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>
17. Moghawry HM, Rashed ME, Gomaa K, AbdelGhani S, Dishisha T. Development of a fast and precise potency test for BCG vaccine viability using flow cytometry compared to MTT and colony-forming unit assays. *Sci Rep*. 2023;13(1):11606.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-38657-x>
18. Абзаева НВ, Кузнецова ИВ, Гостищева СЕ, Жиров АМ, Ковалев ДА, Костроминов АВ и др. Перспективы применения метода проточной цитометрии в оценке качества препарата вакцины чумной живой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):560–9.
Abzaeva NV, Kuznetsova IV, Gostischeva SE, Zhiron AM, Kovalev DA, Kostrominov AV, et al. Prospects for using flow cytometry in the quality control of live plague vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):560–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-560-569>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Т.И. Немировская** – общее руководство, концепция, критический пересмотр текста рукописи и утверждение окончательной версии статьи для публикации; **И.В. Касина** – обобщение и анализ регуляторных требований к показателям качества бруцеллезной, туляремийной вакцин и перспектив усовершенствования методов их контроля качества, написание и обсуждение текста рукописи; **Н.В. Александрова** – обобщение и анализ регуляторных требований к показателям качества туберкулезной вакцины (БЦЖ) и перспектив усовершенствования методов контроля качества, обсуждение и написание текста рукописи; **С.А. Алексеева** – обобщение и анализ регуляторных требований к показателям качества сибиреязвенной, чумной вакцин и перспектив усовершенствования методов их контроля качества, обсуждение и редактирование текста рукописи.

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены *таблицы 1, 2*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466-table1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466-table2>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **T.I. Nemirovskaya** provided general guidance, conceptualised the study, critically revised the manuscript, and approved the final version for publication. **I.V. Kasina** collated and analysed regulatory requirements for quality attributes of brucellosis and tularemia vaccines, studied prospects for the improvement of quality control methods for these vaccines, drafted and discussed the manuscript. **N.V. Aleksandrova** collated and analysed regulatory requirements for quality attributes of tuberculosis vaccines (BCG), studied prospects for the improvement of quality control methods for these vaccines, drafted and discussed the manuscript. **S.A. Alekseeva** collated and analysed regulatory requirements for quality attributes of anthrax and plague vaccines, studied prospects for the improvement of quality control methods for these vaccines, discussed and edited the manuscript.

Additional information. *Tables 1, 2* are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466-table1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-456-466-table2>

Об авторах / Authors

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

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

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

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

Александрова Наталья Владимировна, канд. мед. наук / **Natalia V. Aleksandrova**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1069-8065>

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

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

Поступила 21.08.2024

После доработки 21.10.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Received 21 August 2024

Revised 21 October 2024

Accepted 6 December 2024