

БИО ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

ISSN 2221-996X (Print)
ISSN 2619-1156 (Online)

Рецензируемый научно-практический журнал
федерального государственного бюджетного учреждения
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Том 20, № 2
Апрель – июнь 2020



Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment

В НОМЕРЕ

Нетуберкулезные микобактерии

Молекулярно-генетическое исследование стабильности и подтверждение подлинности штамма Внуково-32, применяемого для производства вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой

Включен в наукометрическую базу данных Science Index
on-line версия журнала www.biopreparations.ru

Архив журнала размещен в российских и международных реферативных и индексных базах данных: Chemical Abstracts (CAS), Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), КиберЛенинка, Российская государственная библиотека, Академия Google (Google Scholar) и др.

Журнал входит в перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Пятилетний импакт-фактор РИНЦ — 0,462.

К публикации принимаются статьи, подготовленные в соответствии с правилами для авторов, размещенными на сайте журнала www.biopreparations.ru.

Все статьи проходят рецензирование не менее чем двумя рецензентами.

Используется модель двойного слепого рецензирования.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается.

Ускоренная публикация не допускается.

Материалы заочных конференций не публикуются.

Воспроизведение или использование другим способом любой части издания без ссылки на журнал является незаконным и влечет за собой ответственность, установленную действующим законодательством Российской Федерации.

ISSN 2221-996X (Print)
ISSN 2619-1156 (Online)

БИО ПРЕПАРАТЫ

**ПРОФИЛАКТИКА,
ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ**

Рецензируемый научно-практический журнал
федерального государственного бюджетного учреждения
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Том 20, № 2
Апрель — июнь 2020

BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie
[**BIO**preparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]

Peer-reviewed scientific and practical journal of
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Volume 20, No. 2
April — June 2020

«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» — журнал ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Создан в 2001 г. как периодическое научное издание Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л. А. Тарасевича. В журнале публикуются статьи по вопросам разработки, стандартизации, контроля качества, производства, регистрации и применения биологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов; профилактики, диагностики и лечения инфекционных, аллергических и иммунопатологических процессов; разработки, совершенствования и применения новых технологий с целью получения медицинских биологических препаратов.

В журнале публикуются обзорные и оригинальные статьи, область исследований которых соответствует медицинской и биологической отраслям науки и научным специальностям: **03.01.00 Физико-химическая биология** (03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.01.07 Молекулярная генетика, 03.01.08 Биотехнология); **14.01.00 Клиническая медицина** (14.01.08 Педиатрия, 14.01.09 Инфекционные болезни, 14.01.16 Фтизиатрия); **14.03.00 Медико-биологические науки** (14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология, 14.03.07 Химиотерапия и антибиотики, 14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология, 14.03.10 Клиническая лабораторная диагностика).



Л. А. Тарасевич

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Амвросьева Тамара Васильевна, д-р мед. наук, проф., РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Республика Беларусь)

Бакулин Михаил Константинович, д-р мед. наук, проф., филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Москва, Россия)

Воробьева Мая Сергеевна, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия)

Дармов Илья Владимирович, д-р мед. наук, проф., филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)

Дегтярев Сергей Харитонович, д-р биол. наук, проф., НПО «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия)

Иванов Вячеслав Борисович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Москва, Россия)

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Мовсисянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Мосягин Вячеслав Дмитриевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Пашенко Юрий Иванович, д-р биол. наук, проф., ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф., ООО «МБЦ «Генериум» (Вольгинский, Владимирская область, Россия)

Чумаков Константин Михайлович, д-р биол. наук, Центр оценки и изучения биологических препаратов, FDA (Силвер-Спринг, Мэриленд, США)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Климов Владимир Иванович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКТОР ПЕРЕВОДА

Губарева Ольга Николаевна, канд. филол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН, ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Брико Николай Иванович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Гинцбург Александр Леонидович, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Дятлов Иван Алексеевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Московская область, Россия)

Зверев Виталий Васильевич, д-р биол. наук, проф., академик РАН, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Кутырев Владимир Викторович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов, Россия)

Львов Дмитрий Константинович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Медуницын Николай Васильевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Михайлов Михаил Иванович, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва, Россия)

Покровский Валентин Иванович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва, Россия)

Савченко Валерий Григорьевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Учайкин Василий Федорович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, Ассоциация педиатров-инфекционистов (Москва, Россия)

Хаитов Рахим Мусаевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва, Россия)

НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Лебединская Елена Владимировна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКТОР

Шестакова Алина Павловна, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment is a journal published by the Federal State Budgetary Institution Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation. It was founded in 2001 as a scientific journal of L. A. Tarasevich State Scientific Research Institute for Standardisation and Control of Biological Products. The journal covers such issues as development, standardisation, quality control, production, authorisation, and use of biological products and biomedical cell products; prevention, diagnosis, and treatment of infectious diseases, allergic diseases, and immunopathological conditions; development, improvement, and use of new technologies for the production of biological products.

The journal publishes original research articles and reviews pertaining to biological and medical areas of research and one of the following specialist fields: **03.01.00 Physicochemical biology** (03.01.06 Biotechnology (including bionanotechnology), 03.01.07 Molecular genetics, 03.01.08 Bioengineering); **14.01.00 Clinical Medicine** (14.01.08 Pediatrics, 14.01.09 Infectious diseases, 14.01.16 Phthisiology); **14.03.00 Medical and Life Sciences** (14.03.06 Pharmacology, clinical pharmacology, 14.03.07 Chemotherapy and antibiotics, 14.03.09 Clinical immunology, allergology, 14.03.10 Clinical pathology).

EDITOR-IN-CHIEF

Yuri V. Olefir, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate,
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITORS-IN-CHIEF

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Zhanna I. Avdeeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Tamara V. Amvrosyeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (Minsk, Republic of Belarus)

Mikhail K. Bakulin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Centre for Strategic Planning (Moscow, Russia)

Maya S. Vorobieva, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Ilya V. Darmov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

Sergey Kh. Degtyarev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., SibEnzyme Ltd (Novosibirsk, Russia)

Vyacheslav B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Chumakov FSC R&D IBP RAS (Moscow, Russia)

Diana T. Levi, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vyacheslav D. Mosyagin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Yuri I. Pashchenko, Dr. Sci. (Biol.), Prof., 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Oblast, Russia)

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., International Biotechnology Center "Generium" (Volginsky, Vladimir Oblast, Russia)

Konstantin M. Chumakov, Dr. Sci. (Biol.), PhD, Center for Biologics Evaluation and Research, FDA (Silver Spring, Maryland, USA)

EXECUTIVE EDITOR

Vladimir I. Klimov, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Associate, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

TRANSLATION EDITOR

Olga N. Gubareva, Cand. Sci. (Philology), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Sergey V. Borisevich, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Corr. Member of RAS, 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Oblast, Russia)

Nikolay I. Briko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya FRCM (Moscow, Russia)

Ivan A. Dyatlov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, FBIS SRCAMB (Obolensk, Moscow Oblast, Russia)

Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Vladimir V. Kutyrev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (Saratov, Russia)

Dmitry K. Lvov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya FRCM (Moscow, Russia)

Nikolay V. Medunitsyn, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Mikhail I. Mikhaylov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of RAS, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russia)

Valentin I. Pokrovsky, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Central Research Institute for Epidemiology (Moscow, Russia)

Valery G. Savchenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia)

Vasily F. Uchaykin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Association of Pediatric Infectiologists of Russia (Moscow, Russia)

Rakhim M. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, NRC Institute of Immunology (Moscow, Russia)

SCIENCE EDITORS

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Elena V. Lebedinskaya, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EDITOR

Alina P. Shestakova, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

БИОПРЕПАРАТЫ

Том 20, № 2

Апрель — июнь 2020

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Актуальные направления применения клеточной терапии в регенеративной медицине**
А. А. Чапленко, М. Д. Хорольский, Е. В. Мельникова, В. А. Меркулов 82
- Биоэтические аспекты совершенствования производства антирабического иммуноглобулина в России**
С. В. Генералов, Е. Г. Абрамова, Ю. К. Гаврилова 89
- Нетуберкулезные микобактерии**
М. В. Макарова, Л. Д. Гунтупова 97
- Вирус Мадариага**
Т. Е. Сизикова, В. Н. Лебедев, С. В. Борисевич 103

Оригинальные статьи

- Молекулярно-генетическое исследование стабильности и подтверждение подлинности штамма Внуково-32, применяемого для производства вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой**
Г. М. Игнатьев, А. С. Оксанич, Л. П. Антонова, Т. Г. Самарцева, С. В. Мосолова, К. М. Мефед, Л. В. Гмыль, Н. А. Нетесова 107
- Характеризация субстанции рекомбинантного эритропоэтина человека, полученной на основе штамма клеток яичника китайского хомячка СНОре – продуцента эритропоэтина**
И. Ф. Радаева, В. А. Терновой, А. О. Семенцова, Н. Б. Думченко, Е. А. Нечаева 116
- Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины бруцеллезной живой по показателю «Специфическая активность»**
И. В. Касина, С. А. Алексеева, Т. И. Немировская 126

Хроника

- Мая Сергеевна Воробьева (к 85-летию со дня рождения)** 136
- Научно-практическая конференция «Экспертиза и регистрация лекарственных средств в ЕАЭС» («РегЛек — ЕАЭС 2020»)** 137

Журнал «Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций

Свидетельство ПИ № ФС77-53128 от 14 марта 2013 г.

Учредитель: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Адрес учредителя и редакции: 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» — Т57941, в каталоге «Издания органов НТИ»
агентства «Роспечать», агентства «Урал-Пресс» — 57941. Тираж 100 экз. Цена свободная

Издатель ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

Типография ООО «Буки Веди»: 115093, Москва, Партийный пер., д. 1, корп. 58, стр. 2

Подписано в печать: 22.06.2020

<https://www.biopreparations.ru>, e-mail: biopreparaty@expmed.ru

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

CONTENTS

Reviews

Current Trends in the Use of Cell Therapy in Regenerative Medicine A. A. Chaplenko, M. D. Khorolskiy, E. V. Melnikova, V. A. Merkulov	82
Bioethical Aspects of Improving the Production of Rabies Immunoglobulin in Russia S. V. Generalov, E. G. Abramova, Yu. K. Gavrilova.	89
Nontuberculous Mycobacteria M. V. Makarova, L. D. Guntupova	97
Madariaga Virus T. E. Sizikova, V. N. Lebedev, S. V. Borisevich	103

Original articles

Molecular Genetic Testing of Stability and Identification of Vnukovo-32 Strain Used for Production of the Cultural Concentrated Purified Inactivated Dry Rabies Vaccine G. M. Ignatyev, A. S. Oksanich, L. P. Antonova, T. G. Samartseva, S. V. Mosolova, K. M. Mefed, L. V. Gmyl, N. A. Netesova	107
Characterisation of Recombinant Human Erythropoietin Obtained from CHOpe—Erythropoietin Producing Strain of Chinese Hamster Ovary Cells I. F. Radaeva, V. A. Ternovoy, A. O. Sementsova, N. B. Dumchenko, E. A. Nechaeva	116
Prospects for Improving Quality Evaluation of the Live Brucellosis Vaccine in Terms of Specific Activity I. V. Kasina, S. A. Alekseeva, T. I. Nemirovskaya	126

Chronicle

Maya Sergeevna Vorobieva (on the 85th Anniversary)	136
Applied Research Conference “Expert Evaluation and Approval of Medicinal Products in the Eurasian Economic Union” (“RegLek EAEU 2020”)	137

Journal “BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment” is registered
in the Federal Service for Supervision of Communications,
Information Technologies and Mass Communications

Certificate PI No. FS77-53128 dated March 14, 2013

Founder: Federal State Budgetary Institution “Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products”
of the Ministry of Health of the Russian Federation

Postal address of the founder and editorial office: 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051

Subscription indices are provided in the catalogue “Pressa Rossii”—T57941,
in the Rospechat agency’ catalogue “Izdaniya organov NTI”—57941. Print run: 100 copies. Free price

Publisher “NEICON ISP” LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114

Printing office “Buki Vedi”: 1/58 Partyny lane, Moscow 115093

Passed for printing: June 22, 2020

<https://www.biopreparations.ru>, e-mail: biopreparaty@expmed.ru

Актуальные направления применения клеточной терапии в регенеративной медицине

А. А. Чапленко¹, М. Д. Хорольский¹, Е. В. Мельникова^{1,*}, В. А. Меркулов^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

Клеточная терапия является ключевым инструментом регенеративной медицины, и вплоть до 2010 года продукты на основе жизнеспособных клеток человека применялись преимущественно для восстановления поврежденных тканей и органов. В настоящее время сфера применения биомедицинских клеточных продуктов значительно расширилась, однако интерес исследователей к использованию клеток в регенеративной медицине остается стабильно высоким. В зависимости от типа ткани и патологии уровень разработки клеточных продуктов значительно отличается: от доклинических и пилотных клинических исследований до зарегистрированных препаратов с многолетним опытом применения. Данный факт, с одной стороны, может быть связан с методологическими особенностями производства и применения клеточных продуктов, с другой — с особенностями дифференцировки типов клеток, используемых в регенеративной медицине, прежде всего мезенхимальных стволовых клеток. Цель работы — анализ современных направлений использования клеточной терапии в регенеративной медицине и перспектив применения существующих технологий. Представлены основные достижения использования клеточной терапии в регенерации кожи, костно-хрящевого аппарата, нервной и сердечно-сосудистой систем. Ключевые механизмы лечебного действия клеточной терапии обусловлены, с одной стороны, потенциалом мультипотентных клеток к дифференцировке, с другой — комплексным (иммуномодулирующим, ангиогенным, пролиферативным) действием экспрессируемого протеома вводимых клеток. Для каждого из показаний описаны зарегистрированные в настоящее время продукты на основе жизнеспособных клеток человека и проанализирован их уровень применения в клинической практике. Перспективным представляется использование в регенеративной медицине разработанных технологий направленной дифференцировки, а также применение индуцированных плюрипотентных клеток.

Ключевые слова: биомедицинские клеточные продукты; клеточная терапия; регенеративная медицина; мезенхимальные стволовые клетки (МСК)

Для цитирования: Чапленко АА, Хорольский МД, Мельникова ЕВ, Меркулов ВА. Актуальные направления применения клеточной терапии в регенеративной медицине. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):82–88. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-82-88>

Контактное лицо: Мельникова Екатерина Валерьевна; MelnikovaEV@expmed.ru

Current Trends in the Use of Cell Therapy in Regenerative Medicine

A. A. Chaplenko¹, M. D. Khorolsky¹, E. V. Melnikova^{1,*}, V. A. Merkulov^{1,2}

¹Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University,
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

Cell therapy is a key tool of regenerative medicine, but until the beginning of the last decade, products based on viable human cells were used primarily to repair damaged tissues and organs. Currently, the field of application of biomedical cell products has expanded significantly, but researchers still show considerable interest in the use of human cells in regenerative medicine. The stage of development of cell products varies significantly depending on the type of tissue and pathology, and ranges from preclinical and pilot clinical trials to authorised drugs with a long history of use. On the one hand, this may be attributed to methodological differences in the production and use of cell products, and on the other, to specific aspects of differentiation of cell types used in regenerative medicine, primarily mesenchymal stem cells. The aim of this study was to analyse current trends in the use of cell therapy in regenerative medicine and prospects for using available technologies. The paper summarises the main achievements in the use of cell therapy for regeneration of skin, bone and cartilage, nervous and cardiovascular systems. The key mechanisms of cell therapy effect are determined, on the one hand, by the differentiation potential of multipotent cells, and on the other, by the complex (immunomodulating, angiogenic, proliferative)

action of the proteome expressed by the administered cells. The paper describes viable cell-based products currently authorised for each indication, and analyses the level of their clinical use. It might be promising to use directed cell differentiation technologies, as well as induced pluripotent cells in regenerative medicine.

Key words: biomedical cell products; cell therapy; regenerative medicine; mesenchymal stem cells (MSC)

For citation: Chaplenko AA, Khorolsky MD, Melnikova EV, Merkulov VA. Current trends in the use of cell therapy in regenerative medicine. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):82–88. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-82-88>

Corresponding author: Ekaterina V. Melnikova; MelnikovaEV@expmr.ru

Основное направление регенеративной медицины — восстановление пораженных органов и тканей с помощью активации собственных стволовых/прогениторных клеток или путем введения таких клеток извне. Клеточная терапия является ключевым инструментом регенеративной медицины, и вплоть до начала 2010 года продукты на основе жизнеспособных клеток человека применялись преимущественно для восстановления поврежденных тканей и органов. В настоящий момент сфера применения биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) значительно расширилась, в ЕС и США зарегистрированы первые препараты на основе клеток человека для лечения наследственных и онкологических заболеваний (например, Kymriah®, Novartis Pharmaceuticals Corporation; Yescarta®, Kite Pharma, Inc.; Strimvelis®, GSK). В то же время интерес исследователей к применению клеточных продуктов для восстановления поврежденных органов и тканей в мире остается стабильно высоким (рис. 1).

В зависимости от типа ткани и патологии значительно отличаются уровни разработки клеточных продуктов: от доклинических и пилотных клинических исследований до зарегистрированных препаратов с многолетним опытом применения [1]. Данный факт, с одной стороны, может быть связан с методологическими особенностями производства и применения клеточных продуктов, с другой — с особенностями дифференцировки типов клеток, использующихся в регенера-

тивной медицине, прежде всего мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

В настоящее время описано применение клеточной терапии для регенерации практически всех типов тканей [2–7]. Однако успехи в использовании БМКП для восстановления разных органов значительно отличаются.

Цель работы — анализ современных направлений использования клеточной терапии в регенеративной медицине и перспектив применения существующих технологий.

Регенерация кожных покровов и эпителия внутренних органов

Основные трудности терапии масштабных повреждений/дефектов кожи и оболочки внутренних органов (например, в результате удаления опухоли) связаны с необходимостью использования аутологичного донорского материала. Так, были проведены исследования по терапии инфекционных ран с помощью введения МСК, в результате которых показаны значительные отличия в динамике заживления инфекционных ран у пациентов основной группы в сравнении с контрольной [8]. Аллогенные кожные трансплантаты в подавляющем большинстве случаев вызывают реакцию отторжения или, в случае приема иммунодепрессантов, развитие оппортунистических инфекций, что, в свою очередь, усугубляет состояние пациента. При применении искусственных материалов сохраняются вероятность

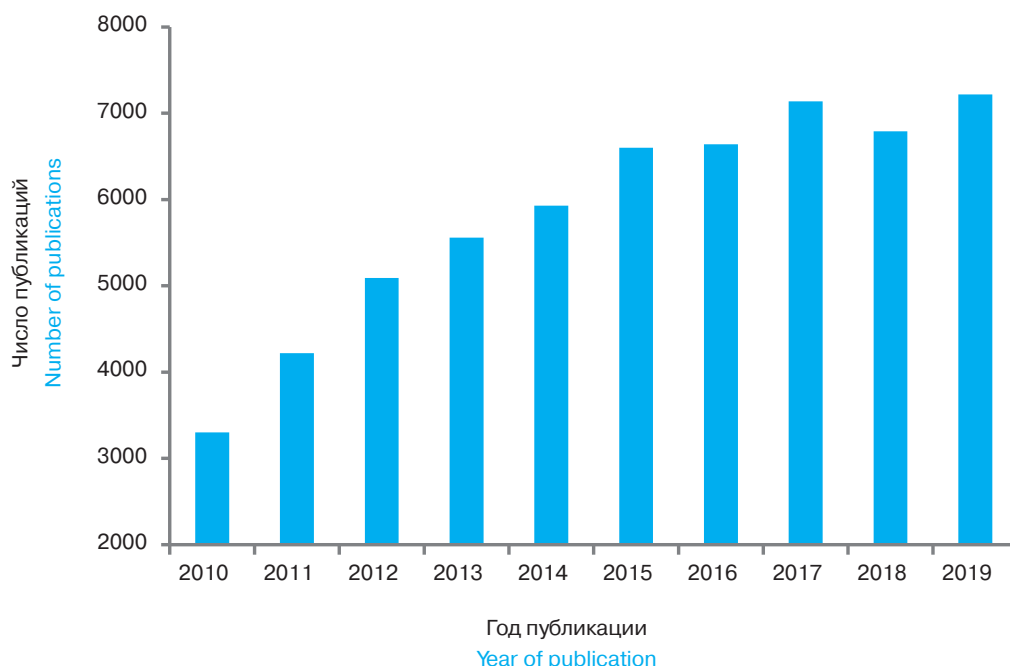


Рис. 1. Динамика изменения публикационной активности ученых в области регенеративной медицины за последние 10 лет (по базам данных Embase и PubMed).

Fig. 1. Changes in the number of publications in the field of regenerative medicine over the past 10 years (according to the Embase and PubMed databases).

отторжения, трудности при замещении поврежденного участка тканями реципиента, нарушение обменных процессов близлежащих тканей из-за невозможности полноценного ангиогенеза (как и в случае использования аллогенных трансплантатов). В качестве альтернативы исследователи предлагают комбинированные продукты, состоящие из биоразлагаемой матрицы (как правило, на основе коллагена или фибрина) в сочетании с прогениторными и дифференцированными клетками (как правило, МСК, кератиноцитами и фибробластами) [9]. Данный тип тканеинженерных продуктов используют при терапии ожогов [10, 11], диабетической стопы [12], периферических свищей [13, 14], а также для послеоперационного восстановления стенок полых органов [15] — пищевода [16], мочевого пузыря [17], некоторых отделов кишечника [18] и трахеи [19, 20].

Различные заболевания полых органов (трахеобронхиальный рак, рак пищевода и кишечника, рак мочевого пузыря, стеноз трахеи) требуют частичной резекции органа с последующей реконструкцией. Перспективным направлением лечения таких состояний является использование комбинированных тканеинженерных трансплантатов. Комбинированные трансплантаты включают децеллюляризованный донорский матрикс (скаффолды), эпителиальные клетки / хондроциты / соединительнотканые волокна, полученные путем дифференцировки МСК костного мозга. В большинстве исследований показано, что децеллюляризованные скаффолды в комбинации с аутологичными клетками являются клинически эффективным и безопасным средством для терапии повреждений полых органов, у значительной части пациентов наблюдалось восстановление не только анатомии органа, но и его физиологических функций [18].

В настоящее время накоплен колоссальный опыт применения подобных тканеинженерных продуктов, проведено более тысячи клинических исследований II и III фаз. Ведущими национальными регуляторными органами зарегистрированы следующие тканеинженерные продукты для регенерации кожи и слизистых на основе аллогенных фибробластов и кератиноцитов:

- Apligraf®, Gintuit® (США);
- Holoderm®, Keraheal™, Cure-skin, Kaloderm, KeraHeal-Allo™ (Южная Корея);
- JACE® (Япония).

Способность МСК к дифференцировке в несколько типов тканей (мультипотентность) позволяет считать данный тип клеток наиболее перспективным для регенерации сложных тканевых структур. Однако в условиях *in vivo* направленная дифференцировка затруднена, а вследствие возможности дедифференцировки возрастают риски туморогенности. В то же время уникальные иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства МСК (наряду с простотой получения МСК из жировой ткани) часто оказываются решающим фактором при использовании данных клеток в регенеративной медицине. Так, в ЕС и Южной Корее зарегистрированы клеточные продукты Alofisel® и Cupistem® соответственно (для лечения периферических свищей при болезни Крона), представляющие собой аллогенные МСК, выделенные из жировой ткани взрослых (25–55 лет) доноров. Ряд аналогичных по составу препаратов находится уже на поздних стадиях клинических исследований. Таким образом, несмотря на ряд вышеперечисленных трудностей, использование МСК для восстановления сложных тканевых структур является перспективным направлением регенеративной медицины.

Регенерация суставов и костей

Регенеративная медицина позволила продвинуться в решении одной из ключевых проблем современной травматологии и ортопедии — восстановлению поврежденных костей и суста-

вов. Из-за аваскулярной природы хряща и ограниченной пролиферации зрелых хондроцитов суставы взрослых пациентов сильно ограничены в своей способности к самовосстановлению. Применяемые в настоящее время в клинической практике методы восстановления хрящевой ткани (остеохондральная трансплантация, стимуляция костного мозга, индуцированный матрицей аутогенный хондрогенез) часто клинически неэффективны и сопряжены с риском отторжения трансплантата [21]. Альтернативная терапия, а именно использование скаффолдов для восстановления хряща и костей, также является недостаточно эффективной, главным образом вследствие значительного отличия структуры трансплантируемых скаффолдов от структуры «родных» остео- или хондроцитов, что препятствует полноценному восстановлению поврежденного участка [22].

Таким образом, развитие подходов к проведению клеточной терапии для регенерации суставной ткани является одним из актуальных направлений регенеративной медицины. Первые доклинические исследования применения прогениторных клеток для восстановления хряща были проведены в 1994 г. [23]. МСК наносились на коллагеновую матрицу и вводились в плечевой сустав кролика. В более поздних исследованиях представлены данные о клеточной терапии хряща у пациентов с хроническим остеоартрозом коленного сустава. Также описано введение аллогенных МСК в смеси с аутологичными хондроцитами [24]. Показана безопасность вышеописанных терапевтических подходов, а их клиническая эффективность подтверждается исследованиями II/III фаз.

Существует значительное количество зарегистрированных клеточных продуктов, предназначенных для регенерации хрящевой ткани на основе аутологичных хондроцитов, суммарный опыт применения которых насчитывает уже более десяти лет [25]:

- MACI® (США);
- ChondroCelect®, Spherex® (ЕС);
- JACC (Япония);
- Chondron, Cartistem® (Южная Корея);
- Cartogen (Австралия, Сингапур).

Восстановление костной ткани также сопряжено с рядом трудностей, основными из которых являются продолжительность и трудоемкость проводимых процедур, а также низкая клиническая эффективность. Несмотря на возможность полной замены кости металлическим или композитным имплантом, невозможно достигнуть полного восстановления ее опорно-двигательной функции вследствие неполной регенерации сопутствующего двигательного аппарата (связок, сухожилий). Причинами данной проблемы являются как отличия физических свойств материала используемого имплантата и кости, так и неспособность имплантата к взаимодействию с организмом. Введение прогениторных клеток в трансплантат позволяет обеспечить лучшее сродство тканей организма с реконструированным участком за счет дифференцировки используемых клеток в остеобласты и затем в остециты. Наиболее доступным и широко используемым видом клеток, применяемым в данных целях, являются МСК [26]. Основные преимущества МСК — способность дифференцироваться в клетки костной ткани при введении комплекса факторов остеогенной дифференцировки и их иммуномодулирующие свойства [27–29]. В опубликованных работах отмечается важность источника выделения стволовых клеток. Сравнительные исследования демонстрируют более высокую ангиогенность МСК, выделенных из пуповинной крови. При использовании данного типа клеток достигается восстановление системы кровоснабжения костной ткани, что способствует ее ускоренной регенерации [30]. Кле-

точная терапия также используется для реконструкции дефектов челюсти (увеличения верхнечелюстного синуса) в стоматологии [31] и восстановления трубчатых костей [32]. Разработки клеточных продуктов, используемых для регенерации кости, реализованы в рамках значительного количества пилотных исследований. В настоящее время зарегистрирован всего один продукт — RMS Ossron™ (Южная Корея), состоящий из аутологичных остеобластов [33].

Регенерация костей и суставов — наиболее используемая и изучаемая область применения в клинической практике препаратов на основе жизнеспособных клеток человека. Опыт применения таких препаратов, которые официально разрешены регуляторными органами США, ЕС, Южной Кореи, в травматологии и стоматологии насчитывает уже более десяти лет.

Регенерация нервной ткани

Способности нервной ткани взрослого человека к регенерации сильно ограничены, в связи с этим практически отсутствуют способы лечения нарушений, связанных с повреждениями органов нервной системы, обладающие доказанной эффективностью. Даже незначительные травмы (надрыв/защемление нервных волокон) требуют дорогостоящего лечения и длительной последующей реабилитации. Серьезные травмы (перелом/ушиб спинного мозга, разрыв периферических нервов) в большинстве случаев приводят к значительному ограничению трудоспособности и снижению качества жизни. Повреждения нервной системы, связанные с развитием нейродегенеративных заболеваний, в большинстве своем также не поддаются лечению (хотя в некоторых случаях возможно достижение ремиссии).

Актуальным направлением регенеративной медицины в сфере терапии повреждений нервной системы является клеточная терапия, сфокусированная в основном на двух областях: травматические повреждения спинного и головного мозга, а также ишемические и геморрагические повреждения центральной нервной системы (ЦНС) [34, 35]. В настоящее время наиболее хорошо изученными клетками, используемыми для регенерации ЦНС, являются МСК костного мозга и МСК, полученные из жировой ткани [36]. В клинических исследованиях показана способность МСК костного мозга стимулировать снижение образования рубцов при повреждениях спинного мозга, а также потенциальная возможность регенерации аксонов при введении клеток данного типа [37]. Исследователями продемонстрирована возможность МСК ингибировать воспалительные процессы в нервной ткани и ускорять восстановление функции нервных волокон, поврежденных вследствие черепно-мозговой травмы [38]. Кроме того, в исследованиях *in vitro* доказано, что МСК могут дифференцироваться в нейроноподобные клетки [39].

В опытах *in vitro* и *in vivo* [40, 41] описана экспрессия клетками МСК маркеров нейрональной и нейроглиальной тканей. Высвобождение специфических цитокинов и факторов роста способствует нейро-, ангио- и синаптогенезу, а также создает благоприятную среду для ремиелинизации ткани во время ее реконструкции [42].

Повреждения периферической нервной системы в основном вызваны механическими травмами. «Золотым стандартом» лечения в данном случае является аутологичная трансплантация нерва (шунтирование нерва реципиента) [43]. Основным ограничением такой терапии служит недостаточность тканей донора для пересадки, в этом случае альтернативным вариантом может быть введение МСК в область повреждения. В об-

зорной статье D. Angius с соавт. [41] описаны эксперименты по регенерации седалищного нерва животных (крыс, мышей, кроликов, собак, кошек, овец, обезьян, свиней) путем местной имплантации мультипотентных клеток, а также при их внутривенном введении. Показан высокий терапевтический потенциал клеточной терапии при лечении повреждений нервной ткани как за счет выделения факторов роста, так и за счет дифференцировки в клетки нейроглии.

Несмотря на значительное число исследований, посвященных тематике применения клеточной терапии для регенерации нервной ткани, большинство из них проводилось на животных или на очень ограниченном числе пациентов, что связано прежде всего с трудностью доставки клеток к местам ее повреждения.

Регенерация сердечной мышцы

Повреждения тканей сердца, связанные с недостаточностью кровоснабжения, по данным на 2018 г. являются одной из главных причин смертности во всем мире¹. Даже в случае успешного купирования острого приступа инфаркта качество жизни пациентов необратимо снижается. Поскольку сердечная поперечнополосатая мышечная ткань имеет ограниченную способность к регенерации, полное восстановление миокарда после инфаркта практически никогда не происходит.

Первое исследование, посвященное успешному применению клеточной терапии для лечения повреждений миокарда у животных, было опубликовано в 2002 г. [44]. Была выдвинута гипотеза, что МСК, вводимые в миокард мыши, преимущественно дифференцируются в кардиомиоциты. Таким образом, дальнейшие исследования оценивали прежде всего потенциал МСК к дифференцировке [45]. Было установлено, что наиболее подходящими для этого являются МСК, выделенные из жировой ткани.

В настоящее время считается, что регенерация сердечной ткани с помощью клеточной терапии основана на следующих механизмах [46]:

- дифференцировка мультипотентных клеток в кардиомиоциты;
- ингибирование фиброза миокарда;
- экспрессия ангиогенных и антиапоптотических факторов, а также цитокинов, стимулирующих пролиферацию кардиомиоцитов.

Данные, полученные по результатам дальнейших клинических исследований [47], позволяют говорить о доказанной безопасности терапии аллогенными МСК, а также об увеличении объема выброса левого желудочка у пациентов с неишемической кардиомиопатией, что связано прежде всего с иммуномодулирующим эффектом вводимых клеток.

Для подтверждения эффективности клеточной терапии у пациентов с иными заболеваниями сердца (инфаркт миокарда, ишемические заболевания сосудов, дилатационная кардиомиопатия и пульмонарная гипертензия) требуются дополнительные исследования [48–50].

В настоящее время зарегистрированы следующие клеточные продукты, предназначенные для регенерации тканей сердца:

- HeartSheet® (Япония) — аутологичные миоциты скелетных мышц;
- Hearticellfram-AMI (Южная Корея) — аутологичные МСК.

Таким образом, ввиду недостаточной эффективности классического лечения заболеваний сердца (или в случае отсутствия ответа пациента на проводимое стандартное лечение)

¹ 10 ведущих причин смерти в мире. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

становится очевидной необходимость дальнейшей разработки, совершенствования и внедрения технологий клеточной терапии. Главным препятствием к изучению и применению препаратов на основе жизнеспособных клеток человека для регенерации сердечной мышцы является сложный инвазивный способ их применения (в большинстве случаев — операция на сердце).

Стимулирование регенерации печени

При тяжелой печеночной недостаточности практически безальтернативным вариантом терапии была и остается трансплантация печени. Многие пациенты не доживают до трансплантации, процедура пересадки является весьма трудоемкой и осложняется высокой вероятностью отторжения трансплантата.

Введение МСК в организм реципиента в процессе трансплантации печени позволяет снизить риск возникновения послеоперационных осложнений, связанных с иммуносупрессивным действием на воспалительную реакцию и процессами отторжения [51]. В большинстве проведенных клинических исследований используют иммуномодулирующие свойства МСК. Также в отдельных публикациях показана способность МСК ингибировать фиброз печеночной ткани и улучшать функцию печени при алкогольном циррозе [52–54]. Введение МСК также предотвращает развитие воспалительных процессов в тканях пересаженного органа [55].

Хотя проведенные клинические исследования [55] подтверждают безопасность введения аллогенных мультипотентных клеток при пересадке печени, их иммуносупрессивный эффект является недостаточным для полноценной замены иммунодепрессантов. Зарегистрированные клеточные продукты, применяемые для регенерации печени, в настоящее время отсутствуют.

Таким образом, перспективным направлением использования МСК при пересадке печени является подавление реакции (host versus graft) отторжения. Изучение механизма подавления этой реакции позволит не только лучше понять протекающие процессы, но и улучшить проведение подобной терапии, а также снизить шансы на возникновение отторжения.

Заключение

Регенеративная медицина является основной областью применения продуктов на основе жизнеспособных клеток человека. Ключевые механизмы лечебного действия клеточной терапии обусловлены, с одной стороны, потенциалом мультипотентных клеток к пролиферации и дифференцировке, с другой — комплексным (иммуномодулирующим, ангиогенным, пролиферативным) действием экспрессируемого протеома вводимых клеток. Уровень достижений в разработке способов клеточной терапии отдельных органов в мире значительно варьирует от небольших пилотных исследований до десятков зарегистрированных ведущими регуляторными органами биомедицинских продуктов. Перспективным представляется использование в регенеративной медицине разработанных технологий направленной дифференцировки МСК, а также применение индуцированных плюрипотентных клеток.

Основным направлением применения прогениторных клеток в регенеративной медицине (ожоги, травматология, стоматология и т. д.) в настоящее время является использование МСК для восстановления сложных тканевых структур (костных и хрящевых, а также кожных покровов). Отдельными разрабатываемыми направлениями применения клеточных препаратов на основе МСК являются восстановление нервной

ткани и тканей сердечной мышцы, однако применение в данной области осложняется труднодоступностью поврежденных тканей и инвазивными методами применения препаратов. Кроме непосредственного восстановления/замещения, препараты на основе МСК, учитывая их иммуносупрессивные свойства и способность подавлять воспаление и отторжение трансплантата, могут применяться при лечении реакции «трансплантат против хозяина».

Вклад авторов. А. А. Чапленко — сбор и анализ информации, изложенной в научной литературе, написание текста; М. Д. Хорольский — сбор публикаций по тематике обзора, доработка текста; Е. В. Мельникова — формирование концепции статьи, критический пересмотр содержания текста; В. А. Меркулов — окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. Aleksandr A. Chaplenko—collection and analysis of information, writing the text; Mikhail D. Khorolsky—compilation of publications on the subject of the review, revision of the text; Ekaterina V. Melnikova—elaboration of the concept of the paper, review of the contents; Vadim A. Merkulov—approval of the final version of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590045-2).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590045-2).

Конфликт интересов. В. А. Меркулов является заместителем главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Vadim A. Merkulov is the Deputy editor-in-chief of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Robb KP, Fitzgerald JC, Barry F, Viswanathan S. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency. *Cytotherapy*. 2019;21(3):289–306. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.10.014>
2. Mehrabani D, Khajehahmadi Z, Tajik P, Tamadon A, Rahmanifar F, Ashraf M, et al. Regenerative effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in thioacetamide-induced liver fibrosis of rats. *Arch Razi Inst*. 2019;74(3):279–86. <https://doi.org/10.22092/ari.2018.110029.1120>
3. Djabali K, Ring J. Mesenchymal stem cells may hold the secret to healing skin disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31(3):387. <https://doi.org/10.1111/jdv.14161>
4. Kichenbrand C, Velot E, Menu P, Moby V. Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy. *Tissue Eng Part B Rev*. 2019;25(1):78–88. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0168>
5. Whelan D, Caplice NM, Clover AJP. Allogeneic MSC persistence may not be necessary for a beneficial effect in burn wound healing. *Burns*. 2017;43(1):247–8. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2015.08.021>
6. Нимирицкий ПП, Сагарадзе ГД, Ефименко АЮ, Макаревич ПИ, Ткачук ВА. Ниша стволовой клетки. *Цитология*. 2018;60(8):575–86. [Nimiritsky PP, Sagaradze GD, Efimenko AYU, Makarevich PI, Tkachuk VA. The stem cell niche. *Tsitologia = Cytology*. 2018;60(8):575–86 (In Russ.)] <https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.08.01>

7. Zhou Y, Zhang X, Xue H, Liu L, Zhu J, Jin T. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis: a meta-analysis. *Stem Cells Int.* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8536785>
8. Сахаб Хайдар А, Третьяк СИ, Недзведь МК, Баранов ЕВ, Надыров ЭА, Лобанок ЕС и др. Особенности регенерации кожного покрова при применении мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани у лабораторных животных с дефектом мягких тканей. *Проблемы здоровья и экологии.* 2012;(2):134–9. [Sahab Haidar A, Tretiak SI, Nedzved MK, Baranov EV, Nadyrov EA, Lobanok ES, et al. The skin regeneration features in application of multipotent mesenchymal stem cells from adipose tissue of laboratory animals with soft tissue defects. *Problemy zdorov'ya i ekologii = Problems of Health and Ecology.* 2012;(2):134–9 (In Russ.)]
9. Laverdet B, Micallef L, Lebreton C, Mollard J, Lataillade JJ, Coulomb B, et al. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. *Pathol Biol.* 2014;62(2):108–17. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.01.002>
10. Abdel-Sayed P, Michetti M, Scaletta C, Flahaut M, Hirt-Burri N, de Buys Roessingh A, et al. Cell therapies for skin regeneration: an overview of 40 years of experience in burn units. *Swiss Med Wkly.* 2019;149:w20079. <https://doi.org/10.4414/smww.2019.20079>
11. Pelizzo G, Avanzini MA, Mantelli M, Croce S, Maltese A, Vestri E, et al. Granulation tissue-derived mesenchymal stromal cells: a potential application for burn wound healing in pediatric patients. *J Stem Cells Regen Med.* 2018;14(1):53–8.
12. Lopes L, Setia O, Aurshina A, Liu S, Hu H, Isaji T, et al. Stem cell therapy for diabetic foot ulcers: a review of preclinical and clinical research. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):188. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0938-6>
13. Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, Baumgart DC, et al. Long-term efficacy and safety of stem cell therapy (Cx601) for complex perianal fistulas in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2018;154(5):1334–42.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.12.020>
14. Carvello M, Lightner A, Yamamoto T, Kotze PG, Spinelli A. Mesenchymal stem cells for perianal Crohn's disease. *Cells.* 2019;8(7):764. <https://doi.org/10.3390/cells8070764>
15. Hendow EK, Guhmann P, Wright B, Sofokleous P, Parmar N, Day RM. Biomaterials for hollow organ tissue engineering. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2016;9:3. <https://doi.org/10.1186/s13069-016-0040-6>
16. Xue X, Yan Y, Ma Y, Yuan Y, Li C, Lang X, et al. Stem-cell therapy for esophageal anastomotic leakage by autografting stromal cells in fibrin scaffold. *Stem Cells Transl Med.* 2019;8(6):548–56. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0137>
17. Chua ME, Farhat WA, Ming JM, McCammon KA. Review of clinical experience on biomaterials and tissue engineering of urinary bladder. *World J Urol.* 2019. <https://doi.org/10.1007/s00345-019-02833-4>
18. Kanetkar NS, Ekenseair AK. Scaffolds for intestinal tissue engineering. In: Mozafari M, Sefat F, Atala A, eds. *Handbook of tissue engineering scaffolds: Volume Two.* Elsevier; 2019. P. 593–632. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102561-1.00024-5>
19. Den Hondt M, Vranckx JJ. Reconstruction of defects of the trachea. *J Mater Sci Mater Med.* 2017;28(2):24. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5835-x>
20. Wu W, Liu Y, Zhao Y. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet.* 2009;373(9665):717–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60428-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60428-1)
21. Walter SG, Ossendorff R, Schildberg FA. Articular cartilage regeneration and tissue engineering models: a systematic review. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2019;139(3):305–16. <https://doi.org/10.1007/s00402-018-3057-z>
22. Садовой МА, Ларионов ПМ, Самохин АГ, Рожнова ОМ. Клеточные матрицы (скаффолды) для целей регенерации кости: современное состояние проблемы. *Хирургия позвоночника.* 2014;(2):79–86. [Sadovoy MA, Lari-onov PM, Samokhin AG, Rozhnova OM. Cellular matrices (scaffolds) for bone regeneration: state of the art. *Hirurgia pozvonochnika = Spine Surgery.* 2014;(2):79–86 (In Russ.)]
23. Wall A, Board T. Mesenchymal cell-based repair of large full thickness defects of articular cartilage. In: Banaszkiewicz PA, Kader DF, eds. *Classic Papers in Orthopaedics.* London: Springer; 2014. P. 441–3. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5451-8_112
24. Orozco L, Munar A, Soler R, Alberca M, Soler F, Huguet M, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation.* 2013;95(12):1535–41. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318291a2da>
25. Golchin A, Farahany TZ. Biological products: cellular therapy and FDA approved products. *Stem Cell Rev Rep.* 2019;15(2):166–75. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9866-1>
26. de Windt TS, Vonk LA, Slaper-Cortenbach ICM, van den Broek MPH, Nizak R, van Rijen MHP, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells stimulate cartilage regeneration and are safe for single-stage cartilage repair in humans upon mixture with recycled autologous chondrons. *Stem Cells.* 2017;35(1):256–64. <https://doi.org/10.1002/stem.2475>
27. Khojasteh A, Fahimipour F, Jafarian M, Sharifi D, Jahangir S, Khayyatan F, et al. Bone engineering in dog mandible: coculturing mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in a composite scaffold containing vascular endothelial growth factor. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017;105(7):1767–77. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33707>
28. Silva-Cote I, Cruz-Barrera M, Cañas-Arboleda M, Correa-Araujo L, Méndez L, Jagielska J, et al. Strategy for the generation of engineered bone constructs based on umbilical cord mesenchymal stromal cells expanded with human platelet lysate. *Stem Cells Int.* 2019;2019:7198215. <https://doi.org/10.1155/2019/7198215>
29. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418(6893):41–9. <https://doi.org/10.1038/nature00870>
30. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* 1988;136:42–60. <https://doi.org/10.1002/9780470513637.ch4>
31. Katagiri W, Watanabe J, Toyama N, Osugi M, Sakaguchi K, Hibi H. Clinical study of bone regeneration by conditioned medium from mesenchymal stem cells after maxillary sinus floor elevation. *Implant Dent.* 2017;26(4):607–12. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000618>
32. Caplan AI. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine. In: Atala A, Lanza R, Mikos AG, Nerem R, eds. *Principles of regenerative medicine.* 3rd ed. Elsevier; 2019. P. 219–27. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-02433-9>
33. Shanbhag S, Suliman S, Pandis N, Stavropoulos A, Sanz M, Mustafa K. Cell therapy for orofacial bone regeneration: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2019;46(Suppl 21):162–82. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13049>
34. van Velthoven CTJ, Kavelaars A, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatr Res.* 2012;71(4 Pt 2):474–81. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.64>
35. Ma YH, Zeng X, Qiu XC, Wei Q-S, Che M-T, Ding Y, et al. Perineurium-like sheath derived from long-term surviving mesenchymal stem cells confers nerve protection to the injured spinal cord. *Biomaterials.* 2018;160:37–55. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.015>

36. Chung CS, Fujita N, Kawahara N, Yui S, Nam E, Nishimura R. A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Med Sci*. 2013;75(7):879–86. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0470>
37. Luo L, He Y, Wang X, Key B, Lee BH, Li H, et al. Potential roles of dental pulp stem cells in neural regeneration and repair. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1731289. <https://doi.org/10.1155/2018/1731289>
38. Wang S, Cheng H, Dai G, Wang X, Hua R, Liu X, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation significantly improves neurological function in patients with sequelae of traumatic brain injury. *Brain Res*. 2013;1532:76–84. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.08.001>
39. Bae KS, Park JB, Kim HS, Kim DS, Park DJ, Kang SJ. Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J*. 2011;52(3):401–12. <https://doi.org/10.3349/yymj.2011.52.3.401>
40. Fesharaki M, Razavi S, Ghasemi-Mobarakeh L, Behjati M, Yarahmadian R, Kazemi M, et al. Differentiation of human scalp adipose-derived mesenchymal stem cells into mature neural cells on electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering applications. *Cell J*. 2018;20(2):168–76. <https://doi.org/10.22074/cellj.2018.4898>
41. Angius D, Wang H, Spinner RJ, Gutierrez-Cotto Y, Yaszemski MJ, Windebank AJ. A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds. *Biomaterials*. 2012;33(32):8034–9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.07.056>
42. Lee SJ, Esworthy T, Stake S, Miao S, Zuo YY, Harris BT, et al. Advances in 3D bioprinting for neural tissue engineering. *Adv Biosyst*. 2018;2(4):1–18. <https://doi.org/10.1002/adbi.201700213>
43. Kornfeld T, Vogt PM, Radtke C. Nerve grafting for peripheral nerve injuries with extended defect sizes. Nerven- und Muskeltransplantation für periphere Nervenverletzungen ausgedehnter Defektgrößen. *Wien Med Wochenschr*. 2019;169(9–10):240–51. <https://doi.org/10.1007/s10354-018-0675-6>
44. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93–8. <https://doi.org/10.1161/hc0102.101442>
45. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med*. 2004;229(7):623–31. <https://doi.org/10.1177/153537020422900706>
46. White IA, Sanina C, Balkan W, Hare JM. Mesenchymal stem cells in cardiology. *Methods Mol Biol*. 2016;1416:55–87. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_4
47. Bartolucci J, Verdugo FJ, González PL, Larrea RE, Abarzua E, Goset C, et al. Safety and efficacy of the intravenous infusion of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with heart failure: a phase 1/2 randomized controlled trial (RIMECARD Trial [Randomized clinical trial of intravenous infusion umbilical cord mesenchymal stem cells on cardiopathy]). *Circ Res*. 2017;121(10):1192–204. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310712>
48. Yang J, Song T, Wu P, Chen Y, Fan X, Chen H, et al. Differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow to sinus node-like cells. *Mol Med Rep*. 2012;5(1):108–13. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.611>
49. Tse HF, Kwong YL, Chan JKF, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*. 2003;361(9351):47–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12111-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12111-3)
50. Shafei AES, Ali MA, Ghanem HG, Shehata AI, Abdelgawad AA, Handal HR, et al. Mesenchymal stem cell therapy: a promising cell-based therapy for treatment of myocardial infarction. *J Gene Med*. 2017;19(12). <https://doi.org/10.1002/jgm.2995>
51. Liu WH, Song FQ, Ren LN, Guo WQ, Wang T, Feng YX, et al. The multiple functional roles of mesenchymal stem cells in participating in treating liver diseases. *J Cell Mol Med*. 2015;19(3):511–20. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12482>
52. Lou G, Yang Y, Liu F, Ye B, Chen Z, Zheng M, et al. MiR-122 modification enhances the therapeutic efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against liver fibrosis. *J Cell Mol Med*. 2017;21(11):2963–73. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13208>
53. Suk KT, Yoon JH, Kim MY, Kim CW, Kim JK, Park H, et al. Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial. *Hepatology*. 2016;64(6):2185–97. <https://doi.org/10.1002/hep.28693>
54. Tsuchiya A, Takeuchi S, Watanabe T, Yoshida T, Nojiri S, Ogawa M, et al. Mesenchymal stem cell therapies for liver cirrhosis: MSCs as “conducting cells” for improvement of liver fibrosis and regeneration. *Inflamm Regen*. 2019;39:18. <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0107-z>
55. Detry O, Vandermeulen M, Delboulle MH, Somja J, Bletard N, Briquet A, et al. Infusion of mesenchymal stromal cells after deceased liver transplantation: a phase I–II, open-label, clinical study. *J Hepatol*. 2017;67(1):47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.001>

Об авторах / Authors

Чапленко Александр Андреевич. Aleksandr A. Chaplenko. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1176-4658>

Хорольский Михаил Дмитриевич. Mikhail D. Khorolsky. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8222-0805>

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук. Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 18.02.2020

После доработки 14.04.2020

Принята к публикации 27.05.2020

Received 18 February 2020

Revised 14 April 2020

Accepted 27 May 2020

Биоэтические аспекты совершенствования производства антирабического иммуноглобулина в России

С. В. Генералов*, Е. Г. Абрамова, Ю. К. Гаврилова

Федеральное казенное учреждение здравоохранения

«Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
ул. Университетская, д. 46, Саратов, 410005, Российская Федерация

Основной целью работы явилась оценка исследований, направленных на развитие производства антирабического иммуноглобулина, с точки зрения биоэтических принципов: обеспечение права пациента на получение качественной фармацевтической помощи и соответствия концепции 3R. При этом следование биоэтическим принципам должно способствовать совершенствованию технологии производства и повышению качества лекарственного средства, что особенно актуально в отношении препарата антирабического иммуноглобулина вследствие его высокой востребованности. В статье проведен анализ современных тенденций по исключению животных в технологии производства антирабического иммуноглобулина. Показаны основные современные направления получения сывороточных препаратов для постэкспозиционной профилактики бешенства. На примере препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина обоснована необходимость совершенствования контроля качества лекарственных средств путем следования принципам 3R. Показан потенциал применения клеточных культур при определении специфической активности антирабического иммуноглобулина. Определены задачи по разработке и применению методов контроля содержания пирогенных примесей без использования животных в соответствии с актуальными фармакопейными документами. Проведена оценка возможности и целесообразности исключения показателя «Аномальная токсичность» в отношении гетерологичного антирабического иммуноглобулина в соответствии с современными международными тенденциями. Определены задачи совершенствования российского производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина, направленные на улучшение качества обеспечения антирабической помощи, включающие увеличение объемов производства для обеспечения доступности препарата пациентам, снижение реактогенности препарата за счет получения рабического антигена с применением культуральных технологий, а также разработку и внедрение методов *in vitro* для проведения контрольных исследований качества препарата по показателям «Специфическая активность», «Пирогенность», «Аномальная токсичность».

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин; бешенство; биоэтика; принципы 3R; методы *in vitro*

Для цитирования: Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Гаврилова ЮК. Биоэтические аспекты совершенствования производства антирабического иммуноглобулина в России. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):89–96. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-89-96>

Контактное лицо: Генералов Сергей Вячеславович; svgeneraloff@gmail.com

Bioethical Aspects of Improving the Production of Rabies Immunoglobulin in Russia

S. V. Generalov*, E. G. Abramova, Yu. K. Gavrilova

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe",

46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russian Federation

The main objective of the present research was to review the studies that look into ways of improving production of anti-rabies immunoglobulin in terms of bioethical principles: ensuring patients' right to receive quality pharmaceutical care, and compliance with the 3R principles. At the same time, compliance with bioethical principles should contribute to the improvement of production technology and the product quality, which is especially important for antirabies immunoglobulin due to the existing high demand for it. The paper analyses the current trends in avoidance of animal use in the production of rabies immunoglobulin. It summarises the main methods of production of serum products for post-exposure prophylaxis of rabies. The example of heterologous rabies immunoglobulin is used to substantiate the need to improve quality control of drugs by following the 3R principles. The paper highlights the potential use of cell cultures for determination of rabies immunoglobulin specific activity. The authors formulated the objectives that include development and use of pyrogen detection methods which do not involve animal use and are consistent with the current pharmacopoeial standards. They assessed the possibility and feasibility of removing Abnormal Toxicity Test for heterologous rabies immunoglobulin in accordance with the current international trends. The formulated objectives imply optimisation of production of heterologous rabies immunoglobulin in Russia in order to improve the quality of antirabies measures. The objectives include higher production volumes to ensure the availability of the product to patients, reduction of the product reactogenicity by using cell-culture technologies for obtaining

rabies antigen, as well as development and implementation of *in vitro* test methods for product quality control in terms of Specific activity, Pyrogenicity, and Abnormal toxicity.

Key words: rabies immunoglobulin; rabies; bioethics; 3R principles; *in vitro* methods

For citation: Generalov SV, Abramova EG, Gavrilova YuK. Bioethical aspects of improving the production of rabies immunoglobulin in Russia. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):89–96. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-89-96>

Corresponding author: Sergey V. Generalov; svgeneraloff@gmail.com

Значение проблемы совершенствования производства препаратов для постэкспозиционной профилактики бешенства сложно переоценить в силу количества людей, которым необходима антирабическая помощь. В мире ежегодно 15 млн человек получают постэкспозиционное антирабическое лечение, в России этот показатель составляет от 200 до 400 тыс. человек [1]. Для оказания антирабической помощи применяют антирабическую вакцину и, в случаях множественных укусов или укусов опасной локализации, антирабический иммуноглобулин. В России для этой цели используют, как правило, антирабический иммуноглобулин, получаемый из сыворотки крови лошади. Введение антирабического иммуноглобулина необходимо для обеспечения нейтрализации вируса бешенства до формирования иммунного ответа на действие вакцины.

Развитие технологии производства антирабического иммуноглобулина, как и других лекарственных препаратов, неразрывно связано с принципами биоэтики, поскольку конечной целью в системе «пациент — медицинский персонал — производитель лекарственного препарата — лекарственный препарат» главным является обеспечение прав гражданина на получение квалифицированной, доступной и своевременной фармацевтической помощи [2]. Основные биоэтические принципы были сформулированы Гиппократом: забота о пользе больного, оказание помощи, непричинение вреда, проявление справедливости и уважения к пациенту.

Таким образом, основными задачами развития технологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина являются повышение его эффективности и безопасности, а также его доступности для пациентов посредством увеличения объемов выпуска препарата. Вместе с тем существует проблема обоснованного и рационального использования животных в производственном цикле, который предполагает их использование в значительном количестве. Ежегодная потребность в животных на этапах производства и контроля антирабического иммуноглобулина составляет более 100 лошадей (средний срок эксплуатации — 5 лет), свыше 3500 кроликов, более 3000 белых мышей и около 20 морских свинок.

В середине XX века учеными W. M. S. Russell и R. L. Burch¹ предложены основы гуманного использования животных, известные как концепция 3R [3]. Базовыми принципами концепции являются замена животных альтернативными моделями (Replacement), уменьшение числа животных в эксперименте (Reduction), улучшение условий обращения с животными (Refinement).

При этом, на наш взгляд, следование концепции 3R при использовании животных в технологии получения иммунобиологического препарата должно не усугублять, а способствовать решению проблемы получения безопасного лекарственного средства с высокой терапевтической активностью.

Цель работы — оценка основных направлений развития российского производства антирабического иммуноглобулина с точки зрения биоэтических принципов: обеспечение права пациента на получение качественной фармацевтической помо-

щи и соответствия концепции 3R. При этом основное внимание обращено на совершенствование технологии получения препарата антирабического иммуноглобулина и системы контроля качества.

Пути совершенствования технологий получения антирабического иммуноглобулина и альтернативных ему препаратов

В России на сегодняшний день единственным производителем антирабического иммуноглобулина является ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Серийный выпуск препарата начат с 2004 г. [4]. Препарат получают из сыворотки крови лошадей, которых иммунизируют материалом, приготовленным на основе мозговой суспензии примированных вирусом бешенства кроликов.

Современные методы очистки, применяемые при производстве препарата, позволяют снизить процент нежелательных реакций у пациентов [4]. Тем не менее проблема реактогенности гетерологичного антирабического иммуноглобулина обуславливает развитие ряда направлений совершенствования технологии получения сывороточных препаратов для профилактики бешенства.

Очевидным решением является разработка технологии производства гомологичного препарата антирабического иммуноглобулина, который считается более безопасным по сравнению с гетерологичным препаратом. Однако недостатком гомологичного препарата является его высокая стоимость, связанная с поиском доноров человеческой сыворотки крови, небольшими объемами производимого препарата, а также необходимостью проведения контрольных испытаний на вирусные заболевания, такие как ВИЧ, вирусные гепатиты и др. [5].

Не менее эффективным путем снижения реактогенности является получение F(ab')₂-фрагментов гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Практический опыт подтвердил эффективность применения подобных препаратов [6], в настоящее время их производство внедрено в нескольких странах. В России также предложены технологические схемы получения препарата на основе F(ab')₂-фрагментов антирабического иммуноглобулина [7, 8]. Экспериментально доказано практически полное отсутствие анафилактических свойств подобного препарата [9].

Следующим направлением совершенствования качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина является применение антирабического антигена на основе культурального вируса для иммунизации животных-продуцентов. К преимуществам указанного направления следует отнести возможность получения более активного и в аллергическом отношении безопасного препарата антирабического иммуноглобулина, исключение трудоемких процессов работы с животными и приготовления вирусосодержащей мозговой суспензии, упрощение процедуры иммунизации продуцентов

¹ Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959. <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>

антирабической сыворотки. Антирабическую сыворотку от лошадей с применением в качестве антигена культуральных вакцин получают в Индии, Таиланде [10, 11]. Для этих целей используют вакцины Rabipur® (Индия) из клеток куриных эмбрионов и вакцину PVRV (Франция) на основе фиксированного вируса бешенства, репродуцированного на перевиваемых клетках Vero. Применение клеток Vero и культурального вируса бешенства экспериментально обосновано и для производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора [4].

Существенным вопросом является исследование эффективности использования рекомбинантных и моноклональных антител для постэкспозиционной профилактики бешенства в качестве альтернативы антирабическому иммуноглобулину [12]. Применение указанных технологий подразумевает использование клеток прокариот и эукариот в качестве систем для продукции вируснейтрализующих антител или их фрагментов вместо животных-продуцентов [13–17]. С 2018 г. препарат антирабических моноклональных антител впервые в мире стал доступен для практического применения [18]. Указанный препарат получил название Rabishield® (Serum Institute of India Pvt. Ltd.). Особенностью его применения является низкая дозировка — 3,33 МЕ на 1 кг массы тела, в сравнении с дозировками гомологичного и гетерологичного препаратов антирабического иммуноглобулина, которые составляют 20 и 40 МЕ на 1 кг массы тела соответственно.

Совершенствование системы контроля препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина

Контроль биологических свойств препарата — специфической активности, токсичности и пирогенности — предполагает использование большого количества животных: белых мышей, кроликов и морских свинок. Безусловно, использование животных как для контроля, так и для производства препарата обуславливает необходимость следования принципу «Refinement», что подразумевает улучшение качества условий воспроизводства, содержания и кормления животных. Следование указанному принципу наиболее наглядно демонстрирует культуру производства и соответствующим образом влияет на результаты [19].

Основательным шагом в развитии системы контроля являются разработка и применение методов *in vitro*, на что также указывает комитет экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по бешенству². Отказ от практики использования лабораторных животных и переход на методы *in vitro* при определении указанных показателей качества являются основными факторами гармонизации российских и международных стандартов [20].

Для использования в производстве антирабического иммуноглобулина разработаны и рекомендованы методы с использованием ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов для количественного определения фиксированного вируса бешенства в антигенном материале, предназначенном для иммунизации лошадей [21], а также различные варианты дот-иммуноанализа с применением диагностикумов на основе наночастиц коллоидных металлов для определения специфической активности иммунных сывороток и антирабического иммуноглобулина [22].

Необходимо отметить, что клеточные культуры представляют собой живую модель для исследования и по этой при-

чине являются более адекватной заменой животным. При репродукции на клеточных культурах вирус бешенства в некоторых случаях способен вызывать деструктивные изменения отдельных клеток и клеточного монослоя, обнаруживаемые методами световой микроскопии. Более ранние изменения ультраструктуры клеток, вызванные вирусом бешенства, могут быть обнаружены методами атомно-силовой микроскопии [23]. Для оценки титра антител в антирабических препаратах ВОЗ и Международное эпизоотическое бюро (МЭБ) рекомендуют применять тест ингибции фокусов флуоресценции (Rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT) и флуоресцентный вируснейтрализующий тест (Fluorescent antibody virus neutralization, FAVN)³. К настоящему времени предложено несколько модификаций указанных методов, различающихся, как правило, используемыми клеточной культурой и штаммом вируса бешенства [24–28]. Аналогичные методы разработаны и в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора для контроля титра антител в антирабических сыворотках [28]. Внедрение разработанных методов возможно после получения достаточного количества результатов, подтверждающих их корреляцию с таковыми, полученными при использовании традиционных методов. При этом целесообразным представляется первоначальное использование указанных методов при контроле промежуточных продуктов производства, а в случае успешного использования и на стадии контроля готового продукта.

Логическим продолжением развития методов, основанных на флуоресценции, является применение проточной цитометрии, особенностью которой является возможность автоматического определения количества инфицированных клеток, что позволит значительно уменьшить количество субъективных ошибок при учете результатов [29].

Отдельного внимания, на наш взгляд, заслуживают иммуноферментные системы для выявления вируса бешенства и антител к нему. К настоящему времени разработано множество различных вариантов ИФА, исследователи приводят данные об эффективности его применения для оценки иммуногенности вакцин, эффективности иммунизации животных [30, 31]. Особенностью ИФА, в отличие от культуральных методов, является возможность работы с инактивированным вирусом бешенства, что повышает биологическую безопасность при проведении анализа.

Одним из показателей биологической безопасности антирабического иммуноглобулина как препарата для парентерального введения является его апиrogenность. В России для определения пирогенных свойств антирабического иммуноглобулина, получаемого из сыворотки крови лошади, используют кроликов согласно ОФС 1.2.4.0005.15 Пирогенность⁴. По мнению ряда исследователей, испытания на кроликах не являются объективными, поскольку существуют различия в реакциях организма человека и кролика на определенные пирогены, а некоторые препараты вызывают у пациентов пирогенные реакции, несмотря на прохождение испытания на пирогенность на кроликах [32, 33]. Согласно указанной фармакопейной статье предполагается повторное использование животных для определения пирогенности, что соответствует концепции 3R. Более того, в Государственной фармакопее Российской Федерации предусмотрена принципиальная возможность использования альтернативных методов определения пирогенов, таких как тест по определению бактериальных эндотоксинов с применением реактива, полученного из мечехвоста (*Lumulus*

² WHO Expert Consultation on Rabies: third report. WHO technical report series 982. WHO; 2018.

³ Там же.

⁴ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0005.15 Пирогенность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

polyphemus или *Tachypleus tridentatus*)⁵, а также определение пирогенных веществ различной природы с применением теста активации моноцитов⁶.

По сравнению с биологическим тестом на кроликах оба теста, тест по определению бактериальных эндотоксинов и тест активации моноцитов, отличаются более высокой чувствительностью, специфичностью и правильностью, для проведения контроля достаточно небольшого количества образца. При этом тест активации моноцитов имеет некоторые преимущества в сравнении с тестом по определению бактериальных эндотоксинов. Во-первых, данный метод, так же как и метод определения пирогенности на кроликах, направлен на обнару-

жение широкого спектра пирогенных примесей, в том числе от микобактерий, грибов, вирусов, химических реагентов и пр. Во-вторых, с точки зрения биоэтики, использование теста активации моноцитов в сравнении с тестом по определению бактериальных эндотоксинов представляется более корректным, поскольку существует угроза исчезновения вида *L. polyphemus* [34]. Решением данной проблемы может быть использование наборов для определения бактериальных эндотоксинов на основе рекомбинантного фактора С [35].

В фармакопеях Европы⁷ и США⁸ при анализе биологических свойств человеческого антирабического иммуноглобулина равнозначно допускается проведение теста

Таблица 1. Основные направления и ожидаемые результаты совершенствования производства антирабического иммуноглобулина с точки зрения принципов биоэтики

Table 1. The main methods and expected results of improving the production of antirabies immunoglobulin in terms of bioethical principles

Направление развития производства Method of improving production	Результат в соответствии с правом человека на получение качественной фармацевтической помощи Result in terms of patients' rights to receive high-quality pharmaceutical care	Результат в соответствии с концепцией 3R Result in terms of the 3R concept
Использование современных методов очистки при изготовлении препарата The use of up-to-date methods of product purification	Снижение реактогенности Reduced reactogenicity	Уменьшение количества лабораторных животных вследствие снижения побочного действия Reduction in the number of laboratory animals due to reduced adverse effects
Разработка технологии получения гомологичного антирабического иммуноглобулина The development of a technology for the production of homologous rabies immunoglobulin	Снижение реактогенности, уменьшение дозировки препарата Reduced reactogenicity, lower dosage of the product	Исключение из технологической схемы животных для получения иммунной сыворотки крови Exclusion of animals from the process of production of immune blood serum
Разработка технологии получения гетерологичного антирабического иммуноглобулина на основе F(ab') ₂ -фрагментов The development of a technology for the production of F(ab') ₂ -fragments-based heterologous rabies immunoglobulin	Снижение реактогенности; повышение специфической активности Reduced reactogenicity; higher specific activity	Уменьшение количества лабораторных животных вследствие снижения побочного действия Reduction in the number of laboratory animals due to reduced adverse effects
Использование культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов The use of cell culture-based rabies antigen for immunisation of producer cells	Снижение реактогенности Reduced reactogenicity	Исключение из технологической схемы животных для получения антигена Exclusion of animals from the process of antigen production
Разработка технологии получения антирабического препарата на основе рекомбинантных моноклональных антител The development of the technology of production of a rabies product based on recombinant monoclonal antibodies	Получение препарата с улучшенными иммунобиологическими свойствами, снижение реактогенности, уменьшение дозировки препарата; увеличение объемов выпуска препарата Production of a product with improved immunobiological properties, reduced reactogenicity, lower dosage of the product; higher production volumes	Исключение из технологической схемы животных для получения иммунной сыворотки крови Exclusion of animals from the process of production of immune blood serum
Разработка и внедрение методов <i>in vitro</i> для контроля биологических свойств препарата The development and implementation of <i>in vitro</i> methods for control of the product's biological properties	Улучшение качества исследований; пролонгация срока годности препарата за счет сокращения времени на проведение контрольных исследований готового препарата Improved quality of research; extension of the product shelf life by reducing the time required for quality control of the finished product	Замена лабораторных животных, используемых для проведения контрольных исследований, либо уменьшение их количества Replacement or reduction of animal tests used in quality control

⁵ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁶ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0016.18 Тест активации моноцитов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁷ European Pharmacopoeia 6th ed. 0723 Human rabies immunoglobulin.

⁸ Rabies immune globulin. USP 41-NF 36.

«Пирогенность» с использованием кроликов и определение бактериальных эндотоксинов и установлено значение порогового содержания бактериальных эндотоксинов, равное 5 МЕ/мл.

В отношении определения пирогенных примесей в препарате антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади, производимого в России, данные о применении тестов активации моноцитов и по определению бактериальных эндотоксинов на сегодняшний день отсутствуют. По этой причине первоочередными задачами при внедрении методов *in vitro* для контроля содержания пирогенных примесей в препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина являются уточнение процедуры пробоподготовки и особенностей проведения реакции, а также определение пороговых значений указанных тестов.

Открытым остается вопрос проведения контрольных испытаний антирабического иммуноглобулина по показателю «Аномальная токсичность», осуществляемых на белых мышах и морских свинках в соответствии с ОФС 1.2.4.0004.15⁹. Многие исследователи считают нецелесообразным проведение указанного теста при производстве фармацевтических препаратов, в том числе вакцин и сывороток¹⁰ [36, 37]. Такое мнение связано с недостаточными возможностями указанного теста для выявления нежелательных реакций у пациента, а также исключением возможности попадания токсичных веществ в лекарственную субстанцию в условиях современного производства, отвечающего требованиям GMP [37]. Последний фактор является ключевым в отношении отказа от проведения теста по показателю «Аномальная токсичность». Необходимым условием для принятия подобных решений должно быть полное соответствие производства рекомендациям ВОЗ в отношении требований GMP, при этом должен быть полностью исключен риск отклонений от регламентированного технологического режима [38] и проведены соответствующие эксперименты, доказывающие возможность исключения показателя «Аномальная токсичность» [39].

Наиболее очевидным решением вопроса исследования токсичных свойств сывороточных препаратов представляется замена животных клеточными культурами. Так, их применение позволило сравнить токсическое действие образцов нормальных и энтеровирусных сывороток, а также выделенного из них специфического иммуноглобулина [40]. В составе препарата антирабического иммуноглобулина отсутствуют токсичные соединения, поэтому отказ от использования животных в этом случае согласуется с международным опытом проведения испытаний на токсичность [19].

Таким образом, в настоящее время существует широкий спектр направлений по совершенствованию российского производства антирабического иммуноглобулина и качества получаемого препарата. Краткое описание направлений совершенствования производства, представленное с точки зрения биоэтических принципов, приведено в таблице 1.

Заключение

Решение биоэтических вопросов тесно взаимосвязано с развитием производства лекарственных препаратов. Принципы биоэтики являются фундаментом для развития научных медицинских, фармацевтических и биотехнологических исследований, в том числе в области разработки технологии получе-

ния антирабических препаратов, совершенствования системы контроля качества.

Право пациента на получение качественной фармацевтической помощи напрямую обуславливает необходимость проведения исследований, направленных на получение препарата антирабического иммуноглобулина с высокой специфической активностью и отсутствием нежелательных реакций при его введении. К таковым направлениям относятся поиск современных способов очистки при изготовлении препарата; получение антирабического иммуноглобулина из иммунной сыворотки крови человека; получение F(ab')₂-фрагментов антирабических антител; использование материала для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки, полученного на клеточной культуре; получение рекомбинантных моноклональных антител, специфичных к вирусу бешенства. Следование концепции 3R прежде всего позволит привести систему контроля качества препарата в соответствие с требованиями международных фармакопей и нормативных документов. Сокращение общего количества животных также положительно отразится на биологической безопасности производства антирабического иммуноглобулина за счет упрощения производственных манипуляций.

При этом первоочередными задачами в развитии российского производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина являются увеличение объемов производства для обеспечения его доступности пациентам, снижение реактогенности за счет получения рабического антигена с применением культуральных технологий, а также разработка и внедрение методов *in vitro* для проведения контрольных исследований качества препарата.

Решение указанных задач требует тщательного изучения, поскольку внедрение в производство технологий *in vitro* не должно оказывать отрицательного влияния на качество контрольных тестов и эффективность препарата.

Вклад авторов. **С. В. Генералов** — обоснование концепции исследования, составление плана статьи, сбор и систематизация данных литературы, формулировка выводов, подготовка текста статьи, оформление рукописи; **Е. Г. Абрамова** — сбор данных литературы, редактирование и коррекция текста статьи, формулировка выводов; **Ю. К. Гаврилова** — сбор данных литературы, подготовка и редактирование текста, оформление рукописи.

Authors' contributions. **Sergey V. Generalov**—substantiation of the research concept, elaboration of the plan of the paper, collection and systematization of literature data, formulation of conclusions, writing and formatting the text; **Elena G. Abramova**—collection of literature data, revising and editing the text, formulation of conclusions; **Yulia K. Gavrilova**—collection of literature data, writing, editing, and formatting the text.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

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

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

⁹ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁰ Tellner P. Deletion of test for abnormal toxicity from European pharmacopoeia. EFPIA; 2017.

Литература/References

- Онищенко ГГ, Попова АЮ, Ежлова ЕБ, Демина ЮВ, Пакскина НД, Писцов МН и др. Эпидемиологическая обстановка и вопросы идентификации вируса бешенства среди людей на территории Российской Федерации в период 2002–2015 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(3):27–32. [Onishchenko GG, Popova AYU, Ezhlova EB, Demina YuV, Pakskina ND, Pistsov MN, et al. Epidemiological situation and problems of identification of rabies virus in humans in the territory of the Russian Federation during the period of 2002–2015. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(3):27–32 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-27-32>
- Белоусова ОВ, Белоусов ЕА, Бугаева АС. Мониторинг оказания фармацевтической помощи населению города Белгорода. *Научный результат. Серия: Медицина и фармация*. 2016;2(1):48–52. [Belousova OV, Belousov YeA, Bugayova AS. Monitoring the pharmaceutical care provision to the population of the city of Belgorod. *Nauchnyy rezul'tat. Seriya: Meditsina i farmatsiya = Research Result. Medicine and Pharmacy Series*. 2016;2(1):48–52 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.18413/2313-8955-2016-2-1-48-52>
- Schutte K, Szczepanska K, Halder M, Cussler K, Sauer UG, Stirling C, et al. Modern science for better quality control of medicinal products "Towards global harmonization of 3Rs in biologicals": The report of an EPAA workshop. *Biologicals*. 2017;48:55–65.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.05.006>
- Абрамова ЕГ, Генералов СВ, Матвеева ЖВ, Жулидов ИМ, Никифоров АК, Комиссаров АВ. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(2):95–101. [Abramova EG, Generalov SV, Matveeva ZhV, Zhulidov IM, Nikiforov AK, Komissarov AV. Experimental substantiation of cultural technologies introduction into manufacturing of anti-rabies immunoglobulin. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(2):95–101 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-95-101>
- Мовсесянц АА, Бутырский АЮ, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Постнова ЕЛ, Мухачева АВ. К вопросу о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015;14(5):85–9. [Movsesyants AA, Butyrskiy AYU, Bondarev VP, Olefir YuV, Postnova EL, Mukhacheva AV. The use of a heterologous anti-rabies immunoglobulin for specific prevention of human rabies. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2015;14(5):85–9 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2015-14-5-85-89>
- Quiambao BP, Dytioco HZ, Dizon RM, Crisostomo ME, Laot TM, Teuwen DE. Rabies post-exposure prophylaxis in the Philippines: health status of patients having received purified equine F(ab')₂ fragment rabies immunoglobulin (Favirab). *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(5):e243.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000243>
- Ситник НП, Исафилов АГ, Загидуллин НВ, Алсынбаев ММ, Тимербаева РХ. Препарат гетерологичного антирабического иммуноглобулина для внутривенного и внутримышечного введения и способ его получения. Патент Российской Федерации № 2339401; 2008. [Sitnik NP, Isafilov AG, Zagidullin NV, Alsynbaev MM, Timerbaeva RKH. Preparation of heterologous antirabic immunoglobulin for intravenous both intramuscular introduction and method for its obtaining. Patent of the Russian Federation No. 2339401; 2008 (In Russ.)]
- Никифоров АК, Дятлов ИА, Волох ОА, Лобовикова ОА, Киреев МН. Получение и анализ основных свойств парата гетерологичного антирабического иммуноглобулина, состоящего из F(ab')₂-фрагментов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2007;(2):75–8. [Nikiforov AK, Dyatlov IA, Volokh OA, Lobovikova OA, Kireyev MN. Manufacturing and analysis of the main characteristics of heterologous anti-rabies immunoglobulin preparation consisting of F(ab')₂ fragments. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2007;(2):75–8 (In Russ.)]
- Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Никифоров АК, Савицкая ЛВ, Галкина МВ, Минаева ЛН и др. Изучение анафилактогенных свойств F(ab')₂-фрагментов гетерологичного антирабического иммуноглобулина. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009;(2):65–7. [Generalov SV, Abramova EG, Nikiforov AK, Savitskaya LV, Galkina MV, Minaeva LN, et al. Study of anaphylactogenic properties of F(ab')₂-fragments of heterologous anti-rabies immunoglobulin. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2009;(2):65–7 (In Russ.)]
[https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-2\(100\)-65-67](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-2(100)-65-67)
- Goel SK, Sharma S, Singh US. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin. *Biologicals*. 2003;31(4):233–6.
[https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00059-9)
- Luekrajat T, Wangsai J, Phanuphak P. Production of antirabies serum of equine origin. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowsky H, eds. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: WHO; 1996. P. 401–4.
- Nagarajan T, Marissen W, Rupprecht C. Monoclonal antibodies for the prevention of rabies: theory and clinical practice. *Antibody Technology Journal*. 2014;4:1–12.
<https://doi.org/10.2147/ANTI.S33533>
- Prosnjak M, Faber M, Hanlon CA, Rupprecht CE, Hooper DC, Dietzschold B. Development of a cocktail of recombinant-expressed human rabies virus-neutralizing monoclonal antibodies for postexposure prophylaxis of rabies. *J Infect Dis*. 2003;188(1):53–6.
<https://doi.org/10.1086/375247>
- Тиллиб СВ, Иванова ТИ, Васильев ЛА, Метлин АЕ, Шмаров ММ, Логунов ДЮ и др. Тримеризованное однодоменное антитело, специфически связывающееся с гликопротеином G вируса бешенства, нейтрализующее вирус бешенства. Патент Российской Федерации № 2533802; 2014. [Tillib SV, Ivanova TI, Vasilev LA, Metlin AE, Shmarov MM, Logunov DJ, et al. Trimerised single-domain antibody that specifically binds with glycoprotein G of rabies virus, neutralising rabies virus. Patent of the Russian Federation No. 2533802; 2014 (In Russ.)]
- Müller T, Dietzschold B, Ertl H, Fooks AR, Freuling C, Fehner-Gardiner C, et al. Development of a mouse monoclonal antibody cocktail for post-exposure rabies prophylaxis in humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(11):e542.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000542>
- Sveshnikov PG, Yagudin TA, Morozkina EV, Klyachko EV, Zatspepin SS, Benevolensky SV, et al. Production of a humanized Fab fragment of a neutralizing antibody against rabies virus. *Moscow Univ Chem Bull*. 2010;65(3):154–8.
<https://doi.org/10.3103/S0027131410030090>
- Ильина ЕН, Солопова ЕВ, Алиев ТК, Ларина МВ, Балабашин ДС, Варламов НЕ и др. Получение и характеристика человеческого моноклонального антитела RabD4, специфичного к гликопротеину вируса бешенства. *Доклады Академии наук*. 2019;485(3):370–3. [Ilina EN, Solopova EV, Aliev TK, Larina MV, Balabashin DS, Varlamov NE, et al. The generation of the human mab RabD4 specific to the rabies virus glycoprotein and characterization thereof. *Doklady Akademii nauk = Proceedings of the Russian Academy of Sciences*. 2019;485(3):370–3 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.31857/S0869-56524853370-373>
- Sparrow E, Torvaldsen S, Newall AT, Wood JG, Sheikh M, Kienny MP, et al. Recent advances in the development of

- monoclonal antibodies for rabies post exposure prophylaxis: a review of the current status of the clinical development pipeline. *Vaccine*. 2019;37(Suppl 1):A132–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.11.004>
19. Каркищенко НН. Основы биомоделирования. М.: Межакадемическое издательство ВПК; 2005. [Karkischenko NN. *The Basics of Biomodelling*. Moscow: Mezhaakademicheskoe izdatel'stvo VPK; 2005 (In Russ.)]
20. Мовсесянц АА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(2):38–41. [Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Shimchuk LF. Quality standards for immunobiological medicinal products — new texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(2):38–41 (In Russ.)]
21. Матвеева ЖВ, Абрамова ЕГ, Генералов СВ, Майоров НВ. Разработка способа количественной оценки содержания фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в рабическом антигене. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова*. 2014;10(2):12–7. [Matveeva ZhV, Abramova EG, Generalov SV, Mayorov NV. Development of a method for the quantitative assessment of the content of the fixed rabies virus of the strain "Moscow 3253" in rabies antigen. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologii imeni Yu. A. Ovchinnikova*. 2014;10(2):12–7. (In Russ.)]
22. Шарапова НА, Абрамова ЕГ, Никифоров АК, Киреев МН, Савицкая ЛВ, Минаева ЛН и др. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010;(1):63–6. [Sharapova NA, Abramova EG, Nikiforov AK, Kireev MN, Savitskaya LV, Minaeva LN, et al. Determination of the activity of the anti-rabies sera and heterologous anti-rabies immunoglobulin *in vitro* in the dot immunoassay. *Problemy osobo opasnykh infektsii* = *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2010;(1):63–6 (In Russ.)] [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-1\(103\)-63-66](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-1(103)-63-66)
23. Генералов СВ, Ерохин ПС, Красовская ТЮ, Осина НА, Абрамова ЕГ, Никифоров АК и др. Изучение ультраструктуры поверхности клеток линии Vero, инфицированных вирусом бешенства (RABV, LISSAVIRUS, RHABDOVIRIDAE). *Вопросы вирусологии*. 2017;62(5):227–32. [Generalov SV, Erokhin PS, Krasovskaya TYu, Osina NA, Abramova EG, Nikiforov AK, et al. A study of the ultrastructure of the surface of the transplantable line Vero cells infected with the rabies virus (RABV, LISSAVIRUS, RHABDOVIRIDAE). *Voprosy virusologii* = *Problems of Virology, Russian Journal*. 2017;62(5):227–32 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-227-232>
24. Bedeković T, Lemo N, Lojkić I, Mihaljević Z, Jungić A, Cvetnić Z, et al. Modification of the fluorescent antibody virus neutralization test—elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies. *J Virol Methods*. 2013;189(1):204–8. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.01.022>
25. Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods*. 1998;212(1):79–87. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00212-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00212-3)
26. Dacheux L, Bourhy H. Virus isolation in cell culture: the rabies tissue culture infection test. In: Rupprecht Ch, Nagara-
- jan Th, eds. *Current laboratory techniques in rabies diagnosis, research and prevention*, Vol. 2. Academic Press; 2015. P. 25–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801919-1.00003-8>
27. Сливко ИА, Недосеков ВВ, Жестерев ВИ, Горшкова ТФ, Курильчук ЮН, Анисимова ЛИ и др. Способ титрования антирабических вируснейтрализующих антител. Патент Российской Федерации № 2254575; 2005. [Slivko IA, Nedosekov VV, Zhesterev VI, Gorshkova TF, Kurilchuk JuN, Anisimova LI, et al. Method for titration of antirabic virus-neutralizing antibodies. Patent of the Russian Federation No. 2254575; 2005 (In Russ.)]
28. Гаврилова ЮК, Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Савицкая ЛВ, Галкина МВ, Кочкин АВ. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции. *Биотехнология*. 2018;34(4):83–8. [Gavrilova YuK, Generalov SV, Abramova EG, Savitskaya LV, Galkina MV, Kochkin AV. Express analysis of activity of anti-rabies serum and anti-rabies immunoglobulin in cell cultures by immunofluorescence method. *Biotechnologiya* = *Biotechnology*. 2018;34(4):83–8 (In Russ.)]
29. Bordignon J, Pires Ferreira SC, Medeiros Caporale GM, Carrieri ML, Kotait I, Lima HC, et al. Flow cytometry assay for intracellular rabies virus detection. *J Virol Methods*. 2002;105(1):181–6. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00064-2](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00064-2)
30. Korimbocus J, Dehay N, Tordoc N, Cano F, Morgeaux S. Development and validation of a quantitative competitive ELISA for potency testing of equine anti rabies sera with other potential use. *Vaccine*. 2016;34(28):3310–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.086>
31. Сухарьков АЮ, Назаров НА, Метлин АЕ. Диагностика бешенства животных методом иммуноферментного анализа, сравнение прямого и непрямого сэндвич-варианта. *Ветеринария Кубани*. 2011;(6):12–4. [Sukharikov AYu, Nazarov NA, Metlin AE. Diagnostics of animal rabies by enzyme immunoassay. Comparison of direct and indirect sandwich ELISA options. *Veterinaria Kubani* = *Kuban Veterinary Medicine*. 2011;(6):12–4 (In Russ.)]
32. Багирова ВЛ, Митькин ОД, Митькина ЛИ. Тест на активацию моноцитов как альтернатива тесту «пирогенность» на кроликах. *Фармация*. 2010;(7):40–2. [Bagirova VL, Mitkin OD, Mitkina LI. The monocyte activation test as an alternative to the rabbit pyrogen test. *Farmatsiya* = *Pharmacy*. 2010;(7):40–2 (In Russ.)]
33. Кукунина ТВ, Исрафилов АГ, Романенкова МЛ, Гайнуллина РС, Федько ЛГ. Особенности контроля препаратов альбумина человека на содержание бактериальных эндотоксинов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(2):100–9. [Kukunina TV, Israfilov AG, Romanenkova ML, Gaynullina RS, Fedko LG. Peculiarities of control of human albumin drugs on the content of bacterial endotoxins. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = *Drug Development & Registration*. 2018;(2):100–9 (In Russ.)]
34. Smith DR, Beekey MA, Brockmann HJ, King TL, Millard MJ, Zaldivar-Rae JA. Limulus polyphemus. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016:e.T11987A80159830. [Downloaded on 03 February 2020] <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T11987A80159830.en>
35. Ding JL, Ho B. Endotoxin detection—from *Limulus* amoebocyte lysate to recombinant factor C. *Subcell Biochem*. 2010;53:187–208. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2_9
36. Гарбе ЙХО, Озборн С, Беггс К, Бопст М, Йос А, Кита-шова АА и др. Исключение теста на аномальную токсичность в качестве теста контроля качества: исторический анализ данных и научные знания. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;(2):184–94. [Garbe JHO, Ausborn S, Beggs C, Bopst M, Joos A, Ki-

- tashova AA, et al. Historical data analyses and scientific knowledge suggest complete removal of the abnormal toxicity test as a quality control test. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development & Registration*. 2015;2(11):184–94 (In Russ.)]
37. Kumar S, Bharti VK, Kumar P, Pandey RP. Proposed deletion of abnormal toxicity test and 3R initiatives for other safety test of biologicals. *SJPS*. 2018;1(1):1–16.
38. Георгиевский ВП, Чайка ЛА, Хованская НП, Гомон ОН, Меркулова ЮВ. Биологические методы контроля качества лекарственных средств в Государственной фармакопее Украины. *Фармаком*. 2002;(3):27–37. [Georgiyevskiy VP, Chaika LA, Khovanskaya NP, Gomon ON, Merkulova YuV. Biological methods of drug quality control in the State Pharmacopoeia of Ukraine. *Farmakom = Pharmacom*. 2002;(3):27–37 (In Ukr.)]
39. Рябцева МС, Филимонова ИН, Осипова ИГ, Неугодова НП, Ковалева ЕЛ, Шаройкина МВ. Показатель качества «аномальная токсичность» — одна из основных составляющих безопасности биологических лекарственных средств. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016;(9–2):232–7. [Ryabtseva MS, Philimonova IN, Osipova IG, Neugodova NP, Kovaleva EL, Sharoykina MV. Quality indicator “abnormal toxicity”—one of the main components of safety of biological drugs. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2016;(9–2):232–7 (In Russ.)]
40. Козлов ВГ, Викторова ЕГ, Набатников ПА. Цитотоксические свойства кроличьих энтеровирусных диагностических сывороток. Особенности и локализация. *Вопросы вирусологии*. 2009;54(1):22–7. [Kozlov VG, Viktorova YG, Nabatnikov PA. Cytotoxic properties of diagnostic rabbit sera to enteroviruses. Specific features and localization. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, Russian Journal*. 2009;54(1):22–7 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Генералов Сергей Вячеславович, канд. биол. наук. *Sergey V. Generalov*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1461-5383>

Абрамова Елена Геннадьевна, д-р биол. наук. *Elena G. Abramova*, Dr. Sci. (Biol.). SPIN-код РИНЦ: 3382-3399

Гаврилова Юлия Кирилловна. *Yulia K. Gavrilova*. SPIN-код РИНЦ: 1863-3588

Поступила 14.02.2020

После доработки 27.04.2020

Принята к публикации 27.05.2020

Received 14 February 2020

Revised 27 April 2020

Accepted 27 May 2020

Нетуберкулезные микобактерии

М. В. Макарова*, Л. Д. Гунтупова

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы
«Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы»,
ул. Стромынка, д. 10, Москва, 107014, Российская Федерация

К настоящему времени в мире резко возросло количество заболеваний, которые связывают с потенциально патогенными микроорганизмами рода *Mycobacterium*, но отличающимися по своим характеристикам от микобактерий туберкулеза. Такие бактерии принято называть атипичными или нетуберкулезными микобактериями (НТМБ), а вызываемые ими заболевания — микобактериозами. НТМБ представлены более чем 20 видами широко распространенных в окружающей среде кислотоустойчивых микроорганизмов, не входящих в состав *M. tuberculosis complex*. Однако значение отдельных видов НТМБ в патологии человека неоднозначно. Цель работы — анализ современного состояния проблемы роста заболеваний, вызываемых нетуберкулезными микобактериями, основных направлений исследований по ранней диагностике микобактериозов, идентификации и изучению лекарственной чувствительности данных микроорганизмов. В статье приведены современные представления о видовых различиях НТМБ, их распространенности и патогенности для человека и животных. Проведен анализ основных мероприятий, направленных на диагностику и лечение заболеваний, вызываемых НТМБ. Приведены результаты исследования чувствительности/устойчивости НТМБ к противотуберкулезным препаратам. Диагностика микобактериозов остается крайне затруднительной, в первую очередь из-за сходства клинико-рентгенологической картины с таковой при туберкулезе. Выявление множественной и широкой лекарственной устойчивости НТМБ к большинству противотуберкулезных препаратов затрудняет лечение вызываемого ими заболевания. В связи с увеличением частоты и распространенности микобактериозов у людей во всем мире, трудностями дифференциальной диагностики, выявлением широкой лекарственной устойчивости НТМБ дальнейшее изучение различных аспектов данного заболевания является особенно важным и актуальным.

Ключевые слова: нетуберкулезные микобактерии; идентификация; микобактериоз; диагностика; лекарственная чувствительность; лекарственная устойчивость

Для цитирования: Макарова МВ, Гунтупова ЛД. Нетуберкулезные микобактерии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):97–102. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-97-102>

Контактное лицо: Макарова Марина Витальевна; makarova75@yandex.ru

Nontuberculous Mycobacteria

M. V. Makarova*, L. D. Guntupova

The Moscow Research and Clinical Center for Tuberculosis Control
of the Moscow Government Department of Health,
10 Stromynka St., Moscow 107014, Russian Federation

There has been a sharp increase in the number of diseases associated with potentially pathogenic microorganisms of the genus *Mycobacterium*, which differ from *Mycobacterium tuberculosis*. These bacteria are known as atypical mycobacteria or nontuberculosis mycobacteria (NTM), and the diseases they cause are called mycobacteriosis. NTMs include more than 20 species of acid-resistant microorganisms that are widespread in the environment and that are not members of the *M. tuberculosis complex*. However, the role of certain types of NTMs in the pathogenesis of human diseases is rather ambiguous. The aim of the paper was to analyse the current rise in the incidence of NTM diseases, as well as the main areas of research on early diagnosis of mycobacteriosis and the detection and testing of drug susceptibility of these microorganisms. The paper summarises current views on NTM species differences, their prevalence and pathogenicity for humans and animals. The authors analysed the main efforts aimed at diagnosis and treatment of NTM diseases. The paper cites the results of the study of NTM susceptibility/resistance to anti-tuberculosis drugs. The diagnosis of mycobacteriosis remains extremely difficult, mainly because of the similarity of the clinico-radiological evidence with that of tuberculosis. Detection of NTM multiple and extensive drug resistance to the majority of anti-tuberculosis drugs complicates the treatment of the NTM disease. Further study of various aspects of NTM diseases is especially important given the increase in the incidence and prevalence of mycobacteriosis all over the world, challenging differential diagnosis, and detection of NTM extensive drug resistance.

Key words: nontuberculous mycobacteria; detection; mycobacteriosis; diagnosis; drug susceptibility; drug resistance

For citation: Makarova MV, Guntupova LD. Nontuberculous mycobacteria. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):97–102. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-97-102>

Corresponding author: Marina V. Makarova; makarova75@yandex.ru

К середине XX века в научной литературе были опубликованы данные о поражениях у человека, сходных с туберкулезными. Выделенные из патологического материала бактерии были отнесены, как и возбудитель туберкулеза, к роду *Mycobacterium*. Эти микобактерии, которые отличались по своим характеристикам от микобактерий туберкулеза (МБТ), в литературе принято называть атипичными или нетуберкулезными микобактериями (НТМБ), а вызываемые ими заболевания — микобактериозами. НТМБ представлены более чем 20 видами широко распространенных в окружающей среде кислотоустойчивых бактерий, не входящих в состав *M. tuberculosis complex*, но являющихся оппортунистическими патогенами диких и домашних животных, птиц и человека. Заболевания, вызываемые разными видами НТМБ, характеризует сходная с туберкулезом клинико-рентгенологическая картина поражения легких, однако схема химиотерапии микобактериозов отличается от таковой при туберкулезе вследствие естественной резистентности НТМБ к противотуберкулезным препаратам. В настоящее время известно более 150 видов/подвидов НТМБ, многие из которых могут вызывать патологию у человека — микобактериоз [1–7].

Наличие хронических неспецифических заболеваний легких, нарушение местного и системного иммунитета у человека приводят к значительному увеличению показателя заболеваемости, связанной с НТМБ, в мире. Факторами, влияющими на частоту возникновения и выявления микобактериоза, являются, с одной стороны, генетическая предрасположенность к возможному поражению микобактериями и с другой стороны — настороженность к данной патологии у специалистов и усовершенствование методов выделения и идентификации микобактерий, рост эпидемических показателей по ВИЧ-инфекции в последние десятилетия [2, 3, 5, 8–11]. Увеличение доли легочных заболеваний, вызванных НТМБ, во многих странах сочетается со снижением заболеваемости туберкулезом. Так, по данным S. Brode и соавт. [12], основанным на 22 исследованиях, проведенных в 16 географических зонах четырех континентов, в 81% регионов имело место снижение числа пациентов с туберкулезом, а в 94% — увеличение патологии, вызываемой НТМБ. Аналогичные данные приводят J. Chien и соавт. [6], D. Prevots и T. Marras [13] и другие авторы.

Цель работы — анализ современного состояния проблемы роста заболеваний, вызываемых нетуберкулезными микобактериями, основных направлений исследований по ранней диагностике микобактериозов, идентификации и изучению лекарственной чувствительности данных микроорганизмов.

Эпидемиология микобактериозов

В частоте патологии, вызываемой различными видами НТМБ, выявлены значительные различия в зависимости от региона.

Основными возбудителями микобактериозов человека являются НТМБ, принадлежащие к видам комплекса *M. avium-intracellulare complex* (MAC), *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. xenopi* [1, 5, 7, 13–16].

При этом MAC чаще выделяют в Северной (44% среди всех НТМБ), чем в Южной Европе (31% от всех НТМБ), *M. xenopi* чаще встречается в Южной (21% от всех изолятов НТМБ), чем в Северной Европе (6%). *M. kansasii* являются второй по ча-

стоте причиной заболеваний легких в некоторых европейских странах, включая Великобританию [17].

В Великобритании, Греции и Нидерландах НТМБ обнаруживаются приблизительно в 2,9, 7,0 и 6,3 случая на 100 тыс. населения, а распространенность микобактериоза легких — в 1,7, 0,7 и 1,4 случая на 100 тыс. населения соответственно [18–20].

В Германии частота обнаружения НТМБ при заболеваниях легких увеличилась с 2,3 до 3,3 случая на 100 тыс. населения (с 2008 по 2014 г.) [21].

В Онтарио (Канада) частота выделения НТМБ из респираторных образцов (без учета наличия истинного заболевания) в последние годы варьировала от 14,1 до 22,2 случая на 100 тыс. населения в год. Было обнаружено, что наиболее распространенными видами НТМБ, вызывающими заболевание легких, являлись MAC, следующие по распространенности — *M. xenopi* и быстрорастущие микобактерии [22].

В штате Орегон (США) распространенность заболевания микобактериозом легких составила 8,6, а в других штатах — от 1,4 до 6,6 случая на 100 тыс. населения [7].

В Японии в 2005 г. распространенность заболеваний легких, вызванных НТМБ, составляла от 33 до 65 случаев на 100 тыс. населения, причем в большинстве случаев это были MAC [23]. Ведущая роль MAC в легочной патологии наблюдалась также в большинстве других стран Восточной Азии [14].

Несмотря на приведенные данные, получение точной картины распространенности микобактериозов не представляется возможным в связи с тем, что эти инфекции не регистрируются в большинстве стран мира. В некоторых странах, где основой постановки диагноза туберкулеза является микроскопия, можно предположить, что у ряда пациентов, у которых диагностирован туберкулез, особенно с лекарственной устойчивостью возбудителя, в действительности может быть заболевание легких, вызванное НТМБ [24, 25].

Например, исследование, проведенное в Китае, показало, что в 3,4% образцов мокроты с положительным результатом микроскопии был получен рост НТМБ, и прежде всего MAC [26].

Частота обнаружения НТМБ в Москве за период с 2006 по 2015 г. увеличилась с 2,5 до 10,6% от всех выделенных культур микобактерий. Наиболее часто встречающимися видами НТМБ в Московском регионе, как и в большинстве стран мира, являются среди медленно растущих — MAC, *M. kansasii*, *M. xenopi*, а среди быстрорастущих — *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* [5].

Виды нетуберкулезных микобактерий

В отличие от строгих патогенов *M. tuberculosis* и *M. leprae*, НТМБ — это в основном свободноживущие природные сапрофиты, которые, как правило, не встречаются в неживой природе. Наибольшее значение в клинической практике имеют виды MAC, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. abscessus* и *M. chelonae*, которые структурно и биохимически сходны с *M. tuberculosis*. Ранее НТМБ называли «атипичными», в настоящее время этот термин устарел, так как по всем признакам они являются типичными представителями рода *Mycobacterium* [6, 27, 28].

Новые виды НТМБ обнаруживают постоянно, их классификация и систематика продолжают развиваться¹. Определение новых видов в последние десятилетия основано в первую очередь на молекулярных методах изучения видоспецифических нуклеотидных последовательностей [29–31].

¹ List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Genus *Mycobacterium*.
<https://lpsn.dsmz.de/genus/mycobacterium>

Заболевания микобактериозами человека и животных

Принято считать, что микроорганизмы из аэрозолей, образующихся над водой и почвой, могут играть важную роль в возникновении респираторных заболеваний².

В то же время обосновано предположение о том, что поступление в организм человека возбудителя с пищей и водой является причиной диссеминированных форм МАС-инфекции с выраженной клиникой со стороны желудочно-кишечного тракта. Этот же источник инфекции играет основную роль и у детей с микобактериальными цервикальными лимфаденитами. Прямое инфицирование НТМБ из воды и других природных источников происходит также у пациентов с повреждениями кожи и мягких тканей [2, 5, 27, 28].

Несмотря на то что НТМБ широко распространены в окружающей среде, заболевания, причиной которых они являются, — относительно редкое явление. Это свидетельствует о том, что основных механизмов защиты хозяина достаточно для предотвращения инфицирования НТМБ. Пациенты, у которых развивается микобактериоз, вероятно, имеют специфические факторы восприимчивости, которые делают их уязвимыми для этих инфекций. Многие заболевания, связанные со структурным повреждением легких, такие как кистозный фиброз, бронхоэктатическая болезнь, хроническая обструктивная болезнь легких, предшествующие туберкулез и пневмококкиоз, были признаны предрасполагающими факторами к заболеваниям легких, вызванных НТМБ [2, 5, 32–34].

Иммуносупрессивный статус, связанный, например, с ВИЧ-инфекцией, трансплантацией или использованием иммунодепрессантов, и другие, в первую очередь генетически обусловленные механизмы, способствуют развитию патологии, вызываемой НТМБ [34–37].

В отличие от туберкулеза, передача НТМБ от человека к человеку считается маловероятной, хотя данные об этом типе передачи были зарегистрированы для пациентов с кистозным фиброзом, инфицированных *M. abscessus* [2].

Диссеминированные поражения, вызванные НТМБ, развиваются, как правило, у пациентов с нарушениями иммунитета, в первую очередь ВИЧ-инфицированных. Заболевания легких, лимфадениты, поражения кожи, подкожной клетчатки, костей и суставов свидетельствуют о том, что НТМБ могут являться этиологическим фактором самой разнообразной патологии человека [2, 4, 5, 9–11, 38].

В патологии, вызываемой разными видами НТМБ, МАС — это основные виды, вызывающие микобактериозы, особенно у ВИЧ-инфицированных лиц. МАС могут быть возбудителями поражения любых органов и тканей. В первую очередь это касается легочных микобактериозов и диссеминированных (генерализованных) поражений [1, 5, 13, 23].

Однако в настоящее время и другие виды НТМБ играют существенную роль (в большей или меньшей степени) в развитии микобактериозов у человека.

Так, среди медленно растущих НТМБ *M. kansasii*, реже *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. haemophilum* и ряд других являются этиологическими факторами заболеваний легких и других органов как у ВИЧ-инфицированных, так и у неинфицированных пациентов. *M. marinum*, *M. ulcerans* также часто вызывают поражения кожи [2, 13, 17, 23, 39].

Быстрорастущие микобактерии комплекса *M. abscessus* / *M. chelonae* (особенно *M. abscessus*), реже *M. fortuitum* / *M. pe-*

regrinum вызывают самую различную патологию легких, костей и суставов, диссеминированные поражения и др. [16, 40, 41].

Описаны также микобактериозы, вызванные и другими видами НТМБ, что в первую очередь зависит от качества работы соответствующей лаборатории и настороженности врачей в отношении данной патологии [2, 5].

Кроме человека НТМБ вызывают различную патологию у животных. НТМБ, вероятно, могут подвергаться «трансмиссии» между внешней средой, особями «дикой природы», домашним скотом и людьми [27, 28].

Диагностика микобактериозов

В отличие от *M. tuberculosis*, выделение НТМБ из патологического материала не всегда свидетельствует об их безусловной этиологической значимости. Возможна случайная контаминация диагностического материала из окружающей среды или колонизация. Вместе с тем, поскольку результаты лечения также различаются в зависимости от вида НТМБ, точное определение их вида очень важно [1, 2, 42, 43].

Диагностика заболевания легких НТМБ требует от специалистов интеграции клинических, рентгенографических и микробиологических данных. Наиболее широко в мире используют диагностические критерии Американского торакального общества и Американского общества инфекционных заболеваний. Главным критерием в постановке диагноза микобактериоза служит многократное выделение одного и того же вида НТМБ из диагностического материала при отсутствии МБТ и наличии клинико-рентгенологических симптомов заболевания. Также диагноз может быть поставлен при однократном выделении НТМБ из материала, полученного в стерильных условиях (операционный материал, абсцесс, спинномозговая жидкость). Симптомы микобактериоза неспецифичны и часто возникают в условиях ранее существовавшего заболевания легких [2].

Выделение *MAC*, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi* и *M. szulgai* из респираторных образцов указывает на относительно высокую вероятность истинного заболевания легких, тогда как менее вирулентные виды, такие как *M. gordonae*, *M. terrae* и комплекс *M. fortuitum*, обычно являются контаминантами, а не возбудителями истинного заболевания легких, вызванного НТМБ [1, 10, 42].

Во всех случаях выделения НТМБ вместе с МБТ приоритет при лечении отдается последним. Дифференциальная диагностика микобактериоза и туберкулеза, в первую очередь с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя, является особенно сложной [2, 24, 25].

Следует подчеркнуть, что при всей необходимости комплексной диагностики заболевания, вызванного НТМБ, ключевую роль играет идентификация вида микобактерий (микробиологическая, молекулярно-генетическая), разумеется, в сочетании с клинико-рентгенологическим исследованием [2, 5, 42, 44].

Лекарственная чувствительность нетуберкулезных микобактерий

Лечение микобактериоза является еще более сложным по сравнению с лечением туберкулеза. Показатель летальности при микобактериозах высокий [2, 45]. Особенности строения клеточной стенки (высокое содержание липидов, низкое содержание пуринов, широкий набор эффлюксных насосов)

² Зверев ВВ, Бойченко МН, Быков АС, Миронов АЮ, Несвижский ЮВ, Пашков ЕП. и др., ред. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Учебник в 2-х томах. Т. 2. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.

и активность цитоплазматических ферментов НТМБ являются причиной их природной устойчивости к большинству противотуберкулезных (ПТП) и других антибактериальных препаратов (АБП) [2, 3, 46–48].

Приобретенная устойчивость обусловлена соответствующими мутациями в геноме микобактерий, которые возникают во время воздействия на них АБП. Эта проблема для НТМБ, в отличие от *M. tuberculosis*, является малоизученной [3, 36, 47]. Вместе с тем, определение лекарственной чувствительности (ЛЧ) НТМБ является важным для назначения адекватной терапии. Однако данных литературы о профилях ЛЧ разных видов НТМБ существенно меньше, чем о ЛЧ *M. tuberculosis* [2, 3, 46, 47, 49]. Различие профилей ЛЧ разных видов НТМБ при отсутствии достоверных данных создает трудности при назначении антибактериальной терапии микобактериозов.

Применение результатов тестирования ЛЧ НТМБ в клинической практике не всегда эффективно из-за частого расхождения между чувствительностью *in vitro* и клиническими результатами *in vivo*. Наиболее широко при проведении тестов на ЛЧ используют метод серийных микроразведений в жидкой питательной среде согласно рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов³. Для медленнорастущих НТМБ установлены корреляции с клиническим ответом для макролидов и амикацина при заболеваниях легких, вызванных *MAC*, и для рифампина — *M. kansasii*. Устойчивость к макролидам *MAC* обусловлена мутациями в гене 23S рРНК. Для быстро-растущих НТМБ рекомендуется определение ЛЧ к амикацину, кларитромицину, имипенему, линезолиду, моксифлоксацину. Индуцируемая устойчивость к макролидам у быстро-растущих НТМБ обусловлена мутациями в гене *erm*, который присутствует в большинстве штаммов *M. abscessus*⁴ [2, 3, 47].

В ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» было проведено исследование лекарственной чувствительности / резистентности к химиопрепаратам ряда НТМБ, наиболее часто вызывающих микобактериозы в Московском регионе. Среди медленно-растущих — это *MAC*, *M. kansasii* и *M. xenopi*, а среди быстро-растущих — *M. chelonae complex (MCC)* и *M. fortuitum complex (MFC)* [49–51].

При сравнении показателей, характеризующих ЛЧ медленно-растущих НТМБ, было установлено, что *MAC* достоверно чаще были более устойчивыми по сравнению с *M. kansasii* и *M. xenopi* к доксициклину, изониазиду, моксифлоксацину, рифампицину, стрептомицину, ципрофлоксацину, этионамиду. Все изученные виды сохраняли чувствительность к амикацину, кларитромицину, моксифлоксацину [50, 52].

При изучении ЛЧ быстро-растущих НТМБ было установлено, что *MFC* были достоверно чаще, чем *MCC* устойчивы к имипенему, кларитромицину, тобрамицину, цефепиму и цефтриаксону. К доксициклину, миноциклину, моксифлоксацину, триметоприм/сульфаметоксазолу, ципрофлоксацину чаще были устойчивы штаммы *MCC*. Большинство штаммов *MCC* и *MFC* были чувствительны к амикацину, линезолиду и цефоксацину [50, 52].

Заключение

НТМБ представляют собой «новые» патогены, которые поражают как лиц с ослабленным иммунитетом, так и иммунокомпетентных. Частота и распространенность заболевания легких НТМБ во всем мире растет. Патология, вызываемая нетуберкулезными микобактериями, в настоящее время ста-

новится очень серьезной проблемой, так как в какой-то степени занимает «нишу», которую «освобождает» туберкулез. Самыми распространенными возбудителями легочной инфекции (которая развивается чаще всего при заражении НТМБ) являются медленно-растущие микобактерии *MAC* и *M. kansasii*, а также быстро-растущие *M. abscessus complex*. Ситуацию осложняет то, что особую опасность НТМБ представляют для лиц с серьезными нарушениями иммунитета (в первую очередь ВИЧ-инфицированных).

Патология, вызываемая НТМБ, имеет черты сходства с туберкулезом. Для дифференциальной диагностики этих заболеваний необходимы надежные современные методы идентификации возбудителей и оценки их устойчивости к антибактериальным препаратам. Это чрезвычайно важно, так как во многих регионах мира данную патологию часто не отличают от туберкулеза, что неблагоприятно влияет на результаты лечения.

Вклад авторов. **М. В. Макарова** — сбор, анализ и систематизация данных литературы, написание текста и оформление рукописи; **Л. Д. Гунтупова** — сбор и обобщение данных литературы, написание и редактирование текста рукописи.

Authors' contributions. **Marina V. Makarova**—collection, analysis and systematisation of literature data, writing and formatting the text; **Lidiya D. Guntupova**—collection and summarising of literature data, writing and editing the text.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was conducted without support from sponsors.

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

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

Литература/References

- Оттен ТФ, Васильев АВ. Микобактериоз. СПб.: Медицинская пресса; 2005. [Otten TF, Vasil'ev AV. *Mycobacteriosis*. St. Petersburg: Meditsinskaya pressa; 2005 (In Russ.)]
- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(4):367–416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>
- Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ Jr. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(3):545–82. <https://doi.org/10.1128/CMR.05030-11>
- Daley CL. Mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013;34(1):1–2. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1333470>
- Литвинов ВИ, Богородская ЕМ, Борисов СЕ, ред. Нетуберкулезные микобактерии, микобактериозы. М.: МНПЦБТ; 2014. [Litvinov VI, Bogorodskaya EM, Borisov SE, eds. *Non-tuberculous mycobacteria, mycobacterioses*. Moscow: MNPCBT; 2014 (In Russ.)]
- Chien JY, Lai CC, Sheng WH, Yu CJ, Hsueh PR. Pulmonary infection and colonization with nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000–2012. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(8):1382–5. <https://doi.org/10.3201/eid2008.131673>
- Adjemian J, Frankland TB, Daida YG, Honda JR, Olivier KN, Zelazny A, et al. Epidemiology of nontuberculous mycobac-

³ Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. 2nd ed. CLSI document M24-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011. https://clsi.org/media/1463/m24a2_sample.pdf

⁴ Там же.

- terial lung disease and tuberculosis, Hawaii, USA. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(3):439–47.
<https://doi.org/10.3201/eid2303.161827>
8. Henkle E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. *Clin Chest Med.* 2015;36(1):91–9. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.11.002>
9. McShane PJ, Glassroth J. Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria: current state and new insights. *Chest.* 2015;148(6):1517–27.
<https://doi.org/10.1378/chest.15-0458>
10. Stout JE, Koh WJ, Yew WW. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. *Int J Infect Dis.* 2016;45:123–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.03.006>
11. Larsson LO, Polverino E, Hoefsloot W, Codecasa LR, Diel R, Jenkins SG, et al. Pulmonary disease by non-tuberculous mycobacteria — clinical management, unmet needs and future perspectives. *Expert Rev Respir Med.* 2017;11(12):977–89.
<https://doi.org/10.1080/17476348.2017.1386563>
12. Brode SK, Daley CL, Marras TK. The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2014;18(11):1370–7. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0120>
13. Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med.* 2015;36(1):13–34.
<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.002>
14. Simons S, van Ingen J, Hsueh PR, Van Hung N, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, et al. Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(3):343–9. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100604>
15. Mencarini J, Cresci C, Simonetti MT, Truppa C, Camiciotoli G, Frilli ML, et al. Non-tuberculous mycobacteria: epidemiological pattern in a reference laboratory and risk factors associated with pulmonary disease. *Epidemiol Infect.* 2017;145(3):515–22.
<https://doi.org/10.1017/S0950268816002521>
16. Brown-Elliott BA, Philley JV. Rapidly growing mycobacteria. *Microbiol Spectr.* 2017;5(1).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0027-2016>
17. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Angeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J.* 2013;42(6):1604–13.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00149212>
18. Henry MT, Inamdar L, O'Riordan D, Schweiger M, Watson JP. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. *Eur Respir J.* 2004;23(5):741–6.
<https://doi.org/10.1183/09031936.04.00114004>
19. Gerogianni I, Papala M, Kostikas K, Petinaki E, Gourgoulis K. Epidemiology and clinical significance of mycobacterial respiratory infections in Central Greece. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12(7):807–12.
20. van Ingen J, Bendien SA, de Lange WC, Hoefsloot W, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, et al. Clinical relevance of nontuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax.* 2009;64(6):502–6.
<https://doi.org/10.1136/thx.2008.110957>
21. Ringshausen FC, Wagner D, de Roux A, Diel R, Hohmann D, Hickstein L, et al. Prevalence of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease, Germany, 2009–2014. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(6):1102–5. <https://doi.org/10.3201/eid2206.151642>
22. Marras TK, Mendelson D, Marchand-Austin A, May K, Jamieson FB. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Ontario, Canada, 1998–2010. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(11):1889–91. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130737>
23. Morimoto K, Iwai K, Uchimura K, Okumura M, Yoshiyama T, Yoshimori K, et al. A steady increase in nontuberculous mycobacteriosis mortality and estimated prevalence in Japan. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;11(1):1–8.
<https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201303-067OC>
24. Shahrahi AH, Heidarieh P, Bostanabad SZ, Khosravi AD, Hashemzadeh M, Khandan S, et al. "Multidrug-resistant tuberculosis" may be nontuberculous mycobacteria. *Eur J Intern Med.* 2015;26(4):279–84.
<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2015.03.001>
25. Yoon HJ, Choi HY, Ki M. Nontuberculosis mycobacterial infections at a specialized tuberculosis treatment centre in the Republic of Korea. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):432.
<https://doi.org/10.1186/s12879-017-2532-4>
26. Shao Y, Chen C, Song H, Li G, Liu Q, Li Y, et al. The epidemiology and geographic distribution of nontuberculous mycobacteria clinical isolates from sputum samples in the eastern region of China. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(3):e0003623.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003623>
27. Falkingham JO 3rd. Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2015;36(1):35–41.
<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.003>
28. Halstrom S, Price P, Thomson R. Review: Environmental mycobacteria as a cause of human infection. *Int J Mycobacteriol.* 2015;4(2):81–91.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0024-2016>
29. Koh WJ. Nontuberculous mycobacteria — overview. *Microbiol Spectr.* 2017;5(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
30. Fedrizzi T, Meehan CJ, Grottola A, Giacobazzi E, Fregni Serpini G, Tagliazucchi S, et al. Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. *Sci Rep.* 2017;7:45258.
<https://doi.org/10.1038/srep45258>
31. Tortoli E, Fedrizzi T, Meehan CJ, Trovato A, Grottola A, Giacobazzi E, et al. The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: The old and the news. *Infect Genet Evol.* 2017;56:19–25. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.013>
32. Chan ED, Iseman MD. Underlying host risk factors for nontuberculous mycobacterial lung disease. *Semin Respir Crit Care Med.* 2013;34(1):110–23.
<https://doi.org/10.1055/s-0033-1333573>
33. Yeh JJ, Wang YC, Sung FC, Chou CY, Kao CH. Nontuberculosis mycobacterium disease is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease: a nationwide cohort study. *Lung.* 2014;192(3):403–11.
<https://doi.org/10.1007/s00408-014-9574-9>
34. Haverkamp MH, van de Vosse E, van Dissel JT. Nontuberculous mycobacterial infections in children with inborn errors of the immune system. *J Infect.* 2014;68(Suppl 1):S134–50.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.09.024>
35. Honda JR, Knight V, Chan ED. Pathogenesis and risk factors for nontuberculous mycobacterial lung disease. *Clin Chest Med.* 2015;36(1):1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.001>
36. Wu UI, Holland SM. Host susceptibility to non-tuberculous mycobacterial infections. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(8):968–80.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00089-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00089-4)
37. Lipner EM, Garcia BJ, Strong M. Network analysis of human genes influencing susceptibility to mycobacterial infections. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146585.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146585>
38. Weiss CH, Glassroth J. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Expert Rev Respir Med.* 2012;6(6):597–612. <https://doi.org/10.1586/ers.12.58>
39. Guarner J. Buruli Ulcer: Review of a neglected skin mycobacterial disease. *J Clin Microbiol.* 2018;56(4):e01507–17.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01507-17>
40. Yano Y, Kitada S, Mori M, Kagami S, Taguri T, Uenami T, et al. Pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: a retrospective study of 44 cases in Japan. *Respiration.* 2013;85(4):305–11. <https://doi.org/10.1159/000339631>
41. Jeong SH, Kim SY, Huh HJ, Ki CS, Lee NY, Kang CI, et al. Mycobacteriological characteristics and treatment outcomes in extrapulmonary *Mycobacterium abscessus* complex infections. *Int J Infect Dis.* 2017;60:49–56.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.05.007>
42. van Ingen J. Microbiological diagnosis of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. *Clin Chest Med.* 2015;36(1):43–54.
<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.11.005>

43. Cowman S, van Ingen J, Griffith DE, Loebinger MR. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2019;54(1):1900250. <https://doi.org/10.1183/13993003.00250-2019>
44. Richter E, Andres S, Hillemann D. Current microbiological methods in the investigation of mycobacteria. *Pneumologie*. 2015;69(5):276–81. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1391960>
45. Fleshner M, Olivier KN, Shaw PA, Adjemian J, Strollo S, Claypool RJ, et al. Mortality among patients with pulmonary non-tuberculous mycobacteria disease. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;20(5):582–7. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0807>
46. Heifets L. *Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections*. Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London: CRC Press; 2000.
47. van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D, Mouton JW. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resist Updat*. 2012;15(3):149–61. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2012.04.001>
48. Philley JV, Griffith DE. Medical management of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease. *Thorac Surg Clin*. 2019;29(1):65–76. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.09.001>
49. Litvinov V, Makarova M, Galkina K, Khachatryan E, Krasnova M, Guntupova L, et al. Drug susceptibility testing of slowly growing non-tuberculous mycobacteria using slomyco test-system. *PLoS One*. 2018;13(9):e0203108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203108>
50. Макарова МВ, Хачатурянц ЕН, Краснова МА, Сафонова СГ, Хахалина АА, Чижова АО и др. Лекарственная чувствительность быстрорастущих микобактерий комплекса *chelonae-abscessus*. *Туберкулез и социально значимые заболевания*. 2018;(2):22–30. [Makarova MV, Khachatryan EN, Krasnova MA, Safonova SG, Khakhalina AA, Chizhova AO, et al. Drug susceptibility of *M. chelonae-abscessus* complex. *Tuberkulez i sotsial'no znachimye zabolevaniya = Tuberculosis and Socially Significant Diseases*. 2018;(2):22–30 (In Russ.)]
51. Макарова МВ, Сафонова СГ, Михайлова ЮД, Гунтупова ЛД, Чижова АО, Литвинов ВИ. Изучение лекарственной чувствительности микобактерий комплекса *fortuitum*. *Туберкулез и социально значимые заболевания*. 2018;(4):20–7. [Makarova MV, Safonova SG, Mikhaylova YuD, Guntupova LD, Chizhova AO, Litvinov VI. The study of drug sensitivity *Mycobacterium fortuitum* complex. *Tuberkulez i sotsial'no znachimye zabolevaniya = Tuberculosis and Socially Significant Diseases*. 2018;(4):20–7 (In Russ.)]
52. Макарова МВ, Хачатурянц ЕН, Краснова МА. Чувствительность нетуберкулезных микобактерий к лекарственным препаратам. *Туберкулез и болезни легких*. 2011;88(6):51–5. [Makarova MV, Khachatryan EN, Krasnova MA. Drug susceptibility of nontuberculous mycobacteria. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*. 2011;88(6):51–5 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Макарова Марина Витальевна, д-р биол. наук. *Marina V. Makarova*, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2686-0952>

Гунтупова Лидия Доржиевна, канд. мед. наук. *Lidiya D. Guntupova*, Cand. Sci. (Med.). SPIN-код РИНЦ: 3043-7777, AuthorID: 718274

Поступила 23.04.2020

После доработки 20.05.2020

Принята к публикации 27.05.2020

Received 23 April 2020

Revised 20 May 2020

Accepted 27 May 2020

Вирус Мадариага

Т. Е. Сизикова, В. Н. Лебедев, С. В. Борисевич*

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации,
ул. Октябрьская, д. 11, Сергиев Посад-6, Московская область,
141306, Российская Федерация

В последнее время происходит расширение ареала распространения заболевания, вызванного вирусом Мадариага. С учетом географического расположения эндемичных по заболеванию регионов, входящих в сферу туристического бизнеса, а также установленной возможности завозных случаев, нельзя исключить появления данного заболевания на территории России. Целью работы является анализ свойств вируса Мадариага (род *Alphavirus*, комплекс вируса восточного энцефаломиелита лошадей) и некоторых эпидемиологических и эпизоотологических характеристик вызываемого им заболевания, характеризующегося диффузным воспалением головного и спинного мозга. По совокупности экологических и молекулярно-генетических характеристик вирус Мадариага классифицирован в качестве отдельного вируса, входящего в комплекс вируса восточного энцефаломиелита лошадей. Доказано, что данный возбудитель может вызывать эпизоотические вспышки у лошадей, инфицировать другие виды млекопитающих (крысы, летучие мыши), а также, возможно, птиц и рептилий. Показано, что резервуаром возбудителя является короткохвостая тростниковая мышь *Zygodontomys brevicauda*. Описаны случаи заболеваний людей, установлен вероятный способ инфицирования человека — трансмиссивный, через укус инфицированных комаров. Комары родов *Culex*, *Aedes*, *Psorophora* являются векторами передачи возбудителя. Проведенные в Панаме серологические исследования выявили наличие антител к вирусу Мадариага у 2–5% обследованных, что свидетельствует о протекании, наряду с клинически выраженной, бессимптомной формы инфекции. Филогенетический анализ штаммов, выделенных от зараженных людей, показал, что штаммы относятся к III линии подтипа вируса восточного энцефаломиелита лошадей, распространенной в Центральной и Южной Америке. Приведены результаты оценки возможных факторов риска инфицирования вирусом Мадариага в эндемичных районах с помощью информационного критерия Акаике. Группы риска в эндемичных районах составляют работники сельскохозяйственных ферм и рыбаки. Результаты исследований указывают на расширение ареала распространения возбудителя, при этом наибольшую эпидемическую опасность представляют штаммы, относящиеся к генетической линии III вируса восточного энцефаломиелита лошадей.

Ключевые слова: вирус Мадариага; восточный энцефаломиелит лошадей; резервуар инфекции; векторы передачи инфекции

Для цитирования: Сизикова ТЕ, Лебедев ВН, Борисевич СВ. Вирус Мадариага. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):103–106. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-103-106>

Контактное лицо: Борисевич Сергей Владимирович; 48cnii@mail.ru

Madariaga Virus

T. E. Sizikova, V. N. Lebedev, S. V. Borisevich*

48 Central Scientific Research Institute,
11 Oktyabr'skaya St., Sergiev Posad-6, Moscow Oblast
141306, Russian Federation

The area affected by the disease caused by Madariaga virus has been expanding recently. Given the geographic location of the endemic regions that overlap with tourist destinations, as well as the confirmed possibility of importing the disease, we cannot rule out the risk of appearance of this disease in Russia. The aim of the study was to analyse the properties of Madariaga virus (*Alphavirus* genus, eastern equine encephalomyelitis virus complex) and some epidemiological and epizootological characteristics of the virus-associated disease which manifests itself in diffuse inflammation of brain and spinal cord. Based on both ecological and molecular genetic characteristics of Madariaga virus, it is classified as an individual virus which is part of the eastern equine encephalomyelitis virus complex. There is evidence that this pathogen can cause epizootic outbreaks in horses, infect other types of mammals (rats, bats), as well as, potentially, birds and reptiles. The reservoir of infection is the short-tailed cane mouse (*Zygodontomys brevicauda*). Human cases have also been described, and the potential route of infection was identified as transmission via mosquito bites. Vectors of pathogen transmission are mosquitoes of the *Culex*, *Aedes*, and *Psorophora* genera. Serological studies carried out in Panama revealed the presence of antibodies to Madariaga virus in 2–5% of the examined patients, which indicates the existence of asymptomatic infection along with clinically apparent infection. Phylogenetic analysis of strains isolated from infected people showed that the strains belong to lineage III of the eastern equine encephalomyelitis virus subtype common in Central and South America. The paper summarises the results of assessment of potential risk factors

of Madariaga virus infection in endemic regions that was performed using the Akaike information criterion. Risk groups in endemic regions are represented by farm workers and fishermen. The results of the studies show that the area affected by the disease is expanding, and the strains that belong to genetic lineage III of the eastern equine encephalomyelitis virus pose the greatest epidemic risk.

Key words: Madariaga virus; eastern equine encephalomyelitis; reservoir of infection; vectors of infection transmission

For citation: Sizikova TE, Lebedev VN, Borisevich SV. Madariaga virus. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):103–106. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-103-106>

Corresponding author: Sergey V. Borisevich; 48cnii@mil.ru

Вирус восточного энцефаломиелита лошадей (ВсЭЛ) относится к семейству *Togaviridae*, роду *Alphavirus*. Экологическая группа арбовирусов образует одноименный антигенный комплекс, включающий в себя два различающихся между собой антигенных подтипа: более вирулентный для человека — североамериканский (уровень летальности среди заболевших достигает 50%) и менее вирулентный — южноамериканский [1].

Вызываемое вирусом ВсЭЛ одноименное заболевание — острая природно-очаговая трансмиссивная инфекция, характеризующаяся диффузным воспалением головного и спинного мозга, протекающая с высокой лихорадкой и выраженными многоочаговыми неврологическими симптомами [2].

Представители южноамериканского подтипа вируса ВсЭЛ в настоящее время рассматриваются в качестве штаммов нового отдельного возбудителя, получившего название вирус Мадариага. Согласно предложенной классификации североамериканский подтип вируса ВсЭЛ образует одну генетическую линию комплекса ВсЭЛ (линия I), которая включает штаммы из Северной Америки [3]. Следовательно, комплекс вируса ВсЭЛ включает два отдельных возбудителя — вирус ВсЭЛ и вирус Мадариага.

Цель работы — анализ свойств вируса Мадариага (род *Alphavirus*, комплекс вируса восточного энцефаломиелита лошадей) и некоторых эпидемиологических и эпизоотологических характеристик вызываемого им заболевания.

Южноамериканский подтип вируса ВсЭЛ, представителем которого является вирус Мадариага, разделен на линии II, III и IV. Данный возбудитель был выделен от животных и человека в странах Южной и Центральной Америки, но не встречался (до недавнего времени) в странах бассейна Карибского моря [1].

Вирус Мадариага вызывает эпизоотические вспышки у лошадей и может инфицировать различные виды млекопитающих, включая крыс и летучих мышей, а также, возможно, птиц и рептилий [3–5]. Резервуаром возбудителя являются короткохвостые тростниковые мыши (*Zygodontomys brevicauda*). Доля серопозитивных животных составляет 8,7% [5].

В 2010 г. зарегистрировано ограниченное количество (13 случаев) заболеваний человека, причем все случаи с симптомами энцефалита выявлены во время вспышки в Дарьене (Панама) [3–5]. Характерной особенностью данной вспышки явилось то, что в ходе нее зарегистрирована одновременная циркуляция вирусов венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ) и Мадариага. Всего было выявлено 100 случаев заболевания с подозрением на инфицирование указанными вирусами, 19 человек были госпитализированы.

Результаты исследования, ранее проведенного в Перу, показали, что, несмотря на многократные зарегистрированные случаи выделения вируса Мадариага от лошадей, не было выявлено ни одного случая выделения возбудителя от человека [6]. Доля серопозитивных лиц была низкая [7]. При исследовании вспышки заболевания лошадей, вызванного виру-

сом Мадариага в Панаме в 1973 г., установлено, что ни один из 1700 обследованных лиц, проживавших в районе, где произошла эпизоотия, не был серопозитивным по отношению к вирусу Мадариага [8]. Однако во время эпидемической вспышки, вызванной вирусом Мадариага в Панаме в 2010 г., уже были зарегистрированы несколько случаев выделения возбудителя от зараженных людей. В большинстве случаев у них были отмечены признаки энцефалита [1]. Проведенные в это время в Панаме серологические исследования выявили наличие антител к вирусу Мадариага у 2–5% обследованных, что свидетельствует о протекании, наряду с клинически выраженной формой заболевания, бессимптомной инфекции [3–5]. Филогенетический анализ установил, что штаммы вируса Мадариага, выделенные во время вспышки 2010 г. в Панаме, были сходны с таковыми, выделенными там же от лошадей в 1984 и 1986 гг., и поэтому не могут рассматриваться как недавно завезенные штаммы [5].

Помимо проб, отобранных от людей, было проведено тестирование образцов крови мелких млекопитающих, собранных в 42 географических районах Панамы [5]. Пробы были исследованы на наличие вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу Мадариага. Кроме этого, тестированию были подвергнуты образцы сывороток крови местных птиц. Уровень вирусемии определяли с помощью метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ). Специфические антитела к вирусу Мадариага определяли с помощью иммуоферментного анализа и в реакции нейтрализации.

Была исследована кровь 32 летучих мышей, относящихся к 16 различным видам, 556 грызунов (12 видов) и 20 опоссумов (4 вида). Наибольшая доля серопозитивных животных (8,3%) выявлена среди короткохвостых тростниковых мышей (*Zygodontomys brevicauda*), у одной крысы была выявлена вирусемия [4, 5]. Из 159 исследованных образцов сывороток крови птиц различных видов вирус Мадариага, как и возбудитель ВЭЛ, выявлен не был. Среди исследованных 770 образцов сывороток крови человека 4,8% были серопозитивны по отношению к вирусу Мадариага и 31,5% по отношению к вирусу ВЭЛ. Антитела к вирусу Мадариага в основном были выявлены среди работников сельскохозяйственных ферм и рыбаков.

Векторами передачи возбудителя являются комары родов *Culex*, *Aedes* и *Psorophora*. Комары *Culex pedrofi* являются основным вектором передачи возбудителя в бассейне Амазонки, комары *Culex taeniopus* — в Панаме. Комары *Psorophora albigena* и особенно *Psorophora ferox* являются весьма активными по отношению к человеку [1].

Комары *Culex pedrofi* ранее не были выявлены в Гаити, однако там присутствуют другие виды комаров данного рода (*Culex atratus*, *Culex carinophilus*, *Culex erraticus*, *Culex pilosus*), а также комары *Psorophora ferox*. Предполагается, что указанные виды комаров являлись основными векторами передачи вируса Мадариага во время эпидемической вспышки в 2015 г. в Гаити [1].

A. Y. Vittor с соавт. [5] оценили возможные факторы риска инфицирования вирусом Мадариага для населения эндемич-

Таблица 1. Факторы риска инфицирования вирусом Мадариага для населения эндемичных регионов [5]
Table 1. Risk factors of Madariaga virus infection in the population of endemic regions [5]

Фактор риска Risk factor	Характеристика показателя Factor characteristics	Количество обследованных Number of examined people	Доля серопозитив- ных лиц, % Proportion of sero- positive people, %	P
Контакт с лошадьми Contacting horses	0–19 ч в нед.* 0–19 h a week*	775	4,4	0,041
	более 20 ч в нед. more than 20 h a week	19	21,1	
Посещение ферм Farming	нет* no*	372	1,9	0,013
	да yes	396	7,5	
Рыбная ловля Fishing	0–9 ч в нед.* 0–9 h a week*	775	4,5	0,027
	более 10 ч в нед. more than 10 h a week	10	20,0	
Наличие кустарника в радиу- се 10 м от места проживания Shrubs within a ten-meter radius from the place of residence	нет* no*	542	1,3	0,003
	да yes	228	6,3	

Примечание. P — значимость различий для групп определенного фактора риска.

*Вариант сравнения.

Note. P—significance of differences for particular risk factor groups.

*Variant of comparison.

ных регионов. Оценка возможности инфицирования вирусом Мадариага проведена с помощью информационного критерия Акаике (an information criterion, AIC) [5]. Данные, представленные в таблице 1, определяют вероятные группы риска в эндемичных регионах.

Различия по тяжести заболевания, отмеченные при анализе вспышки в Панаме в 2010 г. и случаев заболевания в Гаити в 2015–2016 гг. [1], можно объяснить либо реальными различиями по патогенности для человека соответствующих штаммов, либо неодинаковой восприимчивостью населения Панамы и Гаити (возможно, за счет различного этнического состава).

Филогенетический анализ штаммов, выделенных от зараженных людей в Гаити, выявил, что штаммы относятся к III линии подтипа вируса ВсЭЛ, которая представляет изоляты из Центральной и Южной Америки. Время появления наиболее позднего общего предка для этой сублинии — 1939 г. (I_{95} : 1931–1948 гг.). В пределах данной линии новые изоляты из гаитянского кластера близки к изолятам, выделенным в Панаме. Время появления наиболее позднего общего предка для гаитянского кластера вируса Мадариага — декабрь 2013 г. (I_{95} : октябрь 2012 — январь 2015 г.), что соответствует времени интродукции вируса на территорию Гаити (вероятно, из Панамы). Оцениваемая скорость эволюции составляет $1,2 \times 10^{-4}$ нуклеотидных замен в год, что согласуется с данными, ранее полученными для вируса Мадариага [3].

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о широком распространении вируса Мадариага на территории Гаити [6]. Результаты секвенирования геномной РНК возбудителя показали, что все выделенные изоляты принадлежат к одному и тому же кластеру, циркулировавшему в Панаме с октября 2012 по январь 2015 г. Полученные результаты свидетельствуют о проникновении вируса Мадариага из Панамы в Гаити, а также указывают на потенциальную возможность дальнейшего распространения возбудителя в страны Карибского бассейна или Северную Америку [9]. В 2007 г. в Европе

был зарегистрирован первый случай завозного ВсЭЛ, закончившийся гибелью заболевшего¹.

Таким образом, вирус Мадариага является эндемичным для регионов, привлекаемых в плане туристического бизнеса. Нельзя исключить (по аналогии с лихорадкой Зика) появления завозных случаев этого заболевания в России. Наибольшую эпидемиологическую опасность представляют штаммы, относящиеся к генетической линии III подтипа вируса ВсЭЛ, распространенной в Центральной и Южной Америке.

Вклад авторов. Т. Е. Сизикова — анализ и обобщение данных литературы по эпидемиологическим и эпизоотологическим характеристикам заболевания, вызванного вирусом Мадариага, оформление рукописи; В. Н. Лебедев — анализ и обобщение данных литературы по таксономии вируса Мадариага как нового представителя комплекса ВсЭЛ; С. В. Борисевич — разработка дизайна исследования, редактирование и переработка рукописи.

Authors' contributions. Tatyana E. Sizikova—analysis and summarising of literature data on epidemiological and epizootological characteristics of the disease caused by Madariaga virus, formatting of the paper; Vitaly N. Lebedev—analysis and summarising of literature data on taxonomic characteristics of Madariaga virus as a new member of the eastern equine encephalomyelitis virus complex; Sergey V. Borisevich—elaboration of the study design, editing and revision of the paper.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. С. В. Борисевич является членом редакционного совета журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Sergey V. Borisevich is a member of the Editorial Council of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

¹ Man in coma after mosquito bite. BBC News; 2007. http://news.bbc.co.uk/2/hi/uk_news/scotland/edinburgh_and_east/7033203.stm

Литература/References

1. Lednicky JA, White SK, Mavian CN, El Badry MA, Telisma T, Salemi M, et al. Emergence of Madariaga virus as cause of acute febrile illness of children, Haiti, 2015–2016. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(1):e0006972. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006972>
2. Федоров ЮВ, Соляник РГ. Биологические свойства и изменчивость вирусов лошадиных энцефаломиелитов. Томск: Изд-во Томского университета; 1977. [Fedorov YuV, Solyanik RG. *Biological properties and variability of equine encephalomyelitis viruses*. Tomsk: Izd-vo Tomskogo universiteta; 1977 (In Russ.)]
3. Arrigo NC, Adams AP, Weaver SC. Evolutionary patterns of eastern equine encephalitis virus in North versus South America suggest ecological differences and taxonomic revision. *J Virol*. 2010;84(2):1014–25. <https://doi.org/10.1128/JVI.01586-09>
4. Carrera JP, Forrester N, Wang E, Vittor AY, Haddow AD, López-Vergès S, et al. Eastern equine encephalitis in Latin America. *N Engl J Med*. 2013;369(8):732–44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1212628>
5. Vittor AY, Armien B, Gonzalez P, Carrera JP, Dominguez C, Valderrama A, et al. Epidemiology of emergent Madariaga encephalitis in a region with endemic Venezuelan equine encephalitis: initial host studies and human cross-sectional study in Darien, Panama. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004554>
6. Turell MJ, O'Guinn ML, Dohm D, Zyzak M, Watts D, Fernandez R, et al. Susceptibility of Peruvian mosquitoes to Eastern equine encephalitis virus. *J Med Entomol*. 2008;45(4):720–5. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[720:sopmte\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[720:sopmte]2.0.co;2)
7. Aguilar PV, Robich RM, Turell MJ, O'Guinn ML, Klein TA, Huaman A, et al. Endemic Eastern equine encephalitis in the Amazon region of Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(2):293–8. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.293>
8. Dietz WH Jr, Galindo P, Johnson KM. Eastern equine encephalomyelitis in Panama: the epidemiology of the 1973 epizootic. *Am J Trop Med Hyg*. 1980;29(1):133–40. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.133>
9. Blohm GM, Lednicky JA, White SK, Mavian CN, Márquez MC, González-García KP, et al. Madariaga virus: identification of a lineage III strain in Venezuelan child with acute undifferentiated febrile illness, in the setting of possible equine epizootic. *Clin Infect Dis*. 2018;67(4):619–21. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy224>

Об авторах / Authors

Сизикова Татьяна Евгеньевна, канд. биол. наук. *Tatyana E. Sizikova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Лебедев Виталий Николаевич, д-р биол. наук, проф. *Vitaly N. Lebedev*, Dr. Sci. (Biol.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН. *Sergey V. Borisevich*, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Corr. Member of RAS. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Поступила 15.05.2020

После доработки 01.06.2020

Принята к публикации 27.05.2020

Received 15 May 2020

Revised 1 June 2020

Accepted 27 May 2020

Молекулярно-генетическое исследование стабильности и подтверждение подлинности штамма Внуково-32, применяемого для производства вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой

Г. М. Игнатьев^{1*}, А. С. Оксанич², Л. П. Антонова¹, Т. Г. Самарцева², С. В. Мосолова¹, К. М. Мефед¹, Л. В. Гмыль¹, Н. А. Нетесова³

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН», пос. Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1, поселение Московский, Москва, 108819, Российская Федерация

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Малый Казенный переулок, д. 5а, Москва, 105064, Российская Федерация

³Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

Бешенство — острая вирусная инфекция, вызываемая вирусом семейства *Rhabdoviridae* рода *Lyssavirus* и характеризующаяся симптомами поражения центральной нервной системы и абсолютной летальностью. Единственной возможностью предотвратить возникновение данного заболевания у людей является вакцинопрофилактика. Одним из препаратов, используемых в этих целях, является вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная сухая, выпускаемая ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН». **Цель работы:** исследование структуры производственного, рабочего посевного вируса бешенства штамма Внуково-32, используемого ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» для производства антирабической вакцины, его генетической стабильности на этапах производства, изучение возможности применения молекулярно-генетических методов для подтверждения подлинности производственного штамма в готовой форме вакцины и изучение нуклеотидной последовательности штамма CVS. **Материалы и методы:** производственный штамм вируса бешенства Внуково-32, рабочие посевные вирусы, готовые серии вакцины антирабической, штамм CVS фиксированного вируса бешенства, используемый для оценки специфического иммунитета. Молекулярно-генетическое исследование проведено с использованием ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией и секвенированием. **Результаты:** представлены результаты анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена G, полученного из производственного штамма Внуково-32, серий рабочего посевного вируса и готовых серий вакцины антирабической, изготовленных в 2012, 2018, 2019 г., штамма фиксированного вируса бешенства CVS, используемого для оценки специфической активности вакцины. Показана возможность применения рестрикционного анализа для подтверждения подлинности штамма Внуково-32 на всех этапах производства, включая готовую форму вакцины. **Заключение:** штаммы Внуково-32 и CVS, используемые в ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН», являются вирусами бешенства. Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена G показал, что штамм Внуково-32 стабилен на разных этапах производства. Полученная нуклеотидная последовательность гена G штамма Внуково-32 депонирована в GenBank (номер MN116503). Показана возможность применения рестрикционного анализа для подтверждения подлинности штамма Внуково-32 вируса бешенства на всех этапах производства, включая готовую форму вакцины.

Ключевые слова: бешенство; ген G; генетическая стабильность; штамм Внуково-32; антирабическая вакцина

Для цитирования: Игнатьев ГМ, Оксанич АС, Антонова ЛП, Самарцева ТГ, Мосолова СВ, Мефед КМ, Гмыль ЛВ, Нетесова НА. Молекулярно-генетическое исследование стабильности и подтверждение подлинности штамма Внуково-32, применяемого для производства вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):107–115. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-107-115>

Контактное лицо: Игнатьев Георгий Михайлович; marburgman@mail.ru

Molecular Genetic Testing of Stability and Identification of Vnukovo-32 Strain Used for Production of the Cultural Concentrated Purified Inactivated Dry Rabies Vaccine

G. M. Ignatyev^{1,*}, A. S. Oksanich², L. P. Antonova¹, T. G. Samartseva², S. V. Mosolova¹, K. M. Mefed¹, L. V. Gmyl¹, N. A. Netesova³

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, 8/1 Township of the Poliomyelitis Institute, Moskovsky cluster, Moscow 108819, Russian Federation

²Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5a Maly Kazenny Lane, Moscow 105064, Russian Federation

³State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Oblast 630559, Russian Federation

Rabies is an acute viral disease caused by a virus of the *Rhabdoviridae* family of the *Lyssavirus* genus, which affects the central nervous system and is characterised by absolute mortality. Vaccination is the only way to prevent the disease in humans. One of the products used for vaccination is a cultural concentrated purified inactivated dry rabies vaccine produced by the Federal State Budgetary Institution of Science "Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences" (hereinafter—Chumakov Center). **The aim of the study** was to examine the structure of the working virus seed of Vnukovo-32 strain used by the Chumakov Center for rabies vaccine production, to assess its genetic stability during production, to explore the possibility of using molecular genetic methods for identification of the production strain in the finished dosage form, and to study the nucleotide sequence of the CVS strain. **Materials and methods:** Vnukovo-32 rabies virus production strain, working virus seeds, finished batches of the rabies vaccine, CVS fixed rabies virus strain used in the assessment of specific immunity. The molecular genetic study was performed using RT-PCR followed by restriction and sequencing. **Results:** the paper presents the results of nucleotide sequence analysis of the G gene fragment obtained from the Vnukovo-32 production strain, batches of the working virus seed, and finished batches of the rabies vaccine produced in 2012, 2018, and 2019, and the CVS fixed rabies virus strain used in the assessment of the vaccine's specific immunity. The study demonstrated that restriction analysis could be used for Vnukovo-32 strain identification at all production stages, including the finished dosage form. **Conclusion:** Vnukovo-32 and CVS strains used by the Chumakov Center are rabies viruses. Analysis of the nucleotide sequence of the G gene fragment showed that the Vnukovo-32 strain remains stable throughout different production stages. The obtained nucleotide sequence of gene G of the Vnukovo-32 strain was deposited in GenBank (accession number MN116503). The study demonstrated that restriction analysis could be used for Vnukovo-32 strain identification at all production stages, including the finished dosage form.

Key words: rabies; gene G; genetic stability; Vnukovo-32 strain; rabies vaccine

For citation: Ignatyev GM, Oksanich AS, Antonova LP, Samartseva TG, Mosolova SV, Mefed KM, Gmyl LV, Netesova NA. Molecular genetic testing of stability and identification of Vnukovo-32 strain used for production of the cultural concentrated purified inactivated dry rabies vaccine. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):107–115. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-107-115>

***Corresponding author:** Georgy M. Ignatyev; marburgman@mail.ru

Несмотря на повсеместное внедрение вакцин против бешенства в практику здравоохранения, во всем мире по-прежнему от вируса погибает около 55 тыс. человек в год. Основная смертность приходится на страны Африки и Азии, где чаще всего умирают дети до 15 лет [1]. Причина такой ситуации в этих регионах кроется в отсутствии вакцинации от бешенства бродячих собак, которые являются основным переносчиком вируса. В то же время в этих странах имеется дефицит препаратов, которые применяются для экстренной профилактики и лечения после укусов животных — таких как антирабический иммуноглобулин и вакцины, а также в доступности медицинской помощи в отдаленных от городов населенных пунктах.

В настоящее время проблеме профилактики и лечения бешенства ВОЗ уделяет огромное внимание. Усилия ученых направлены на разработку более эффективных вакцин, вызывающих стойкий и длительный иммунитет уже после первого введения, и на снижение стоимости таких препаратов. Разрабатывается ряд новых видов вакцин от бешенства с адъювантами второго поколения, такими как агонист толл-подобного рецептора-3 (aTLR-3), состоящий из синтетической дцРНК, кодирующей aTLR-3, и полиинозин-полицитидиловой

кислоты, стабилизированной канамицином и кальцием [2]. Рекомбинантные вакцины, состоящие из рекомбинантного гликопротеина вируса бешенства, получаемого в эукариотических системах экспрессии белка, разрабатываются в Индии [3]. Применяют также генетическую модификацию вируса бешенства для создания живых аттенуированных вакцин, используя удаление генов, кодирующих фосфопротеин [4] или матриксный белок [5], что приводит к отсутствию инфекции даже у иммунокомпрометированных мышей. Другой пример генетически модифицированного вируса — это введение в геном вируса второй нуклеотидной последовательности, кодирующей гликопротеин. Такой вирус имел более высокую патогенность по сравнению с диким вирусом, но после инактивации вызывал у мышей и собак более сильный и быстрый иммунный ответ после однократного введения, чем та же доза инактивированного дикого исходного вируса [6]. Среди вакцин для профилактики бешенства у человека и животных можно выделить генетические (ДНК или РНК) вакцины, которые применяются как в чистом виде, так и в форме вирусных или бактериальных векторов [3]. Особое внимание в проводимых работах уделяется генетической стабильности применяемых вакцинных штаммов

Таблица 1. Виды вируса бешенства, включенные в род *Lyssavirus*, их первичные хозяева, распространение и соответствие филогруппам [8–10]

Table 1. Types of rabies viruses covered by the *Lyssavirus* genus, their primary hosts, habitats, and phylogroups [8–10]

Принятые и предполагаемые виды Established and assumed species	Выявленный первичный хозяин Confirmed primary host	Регион распространения Habitat	Филогруппа Phylogroup
<i>Rabies virus</i> (RABV)	Хищники и летучие мыши <i>Predators and bats</i>	Везде, кроме Австралии и некоторых островов; летучие мыши — только в Америке <i>Everywhere except Australia and some islands; bats—only in America</i>	I
<i>Duvenhage virus</i> (DUVV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Eptesicus serotinus</i>) <i>Insectivorous bats (Eptesicus serotinus)</i>	Африка (суб-Сахара) <i>Africa (sub-Saharan)</i>	
<i>European bat lyssavirus, type 1</i> (EBLV-1)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Eptesicus serotinus</i>) <i>Insectivorous bats (Eptesicus serotinus)</i>	Большая часть Европы (от Испании до Украины) <i>Most of Europe (from Spain to Ukraine)</i>	
<i>European bat lyssavirus, type 2</i> (EBLV-2)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Myotis daubentonii</i> , <i>M. dasycneme</i>) <i>Insectivorous bats (Myotis daubentonii, M. dasycneme)</i>	Северо-Западная Европа <i>Northwest Europe</i>	
<i>Australian bat lyssavirus</i> (ABLV)	Летучие мыши (<i>Pteropus</i> spp., <i>Saccolaimus albiventris</i>) <i>Bats (Pteropus spp., Saccolaimus albiventris)</i>	Австралия <i>Australia</i>	
<i>Irkut virus</i> (IRKV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Murina leucogaster</i>) <i>Insectivorous bats (Murina leucogaster)</i>	Восточная Азия <i>Eastern Asia</i>	
<i>Khujand virus</i> (KHUV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Myotis mystacinus</i>) <i>Insectivorous bats (Myotis mystacinus)</i>	Центральная Азия <i>Central Asia</i>	
<i>Aravan virus</i> (ARAV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Myotis blythi</i>) <i>Insectivorous bats (Myotis blythi)</i>	Центральная Азия <i>Central Asia</i>	
<i>Bokeloh bat lyssavirus</i> (BBLV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Myotis nattereri</i>) <i>Insectivorous bats (Myotis nattereri)</i>	Франция, Германия <i>France, Germany</i>	
<i>Gannoruwa bat lyssavirus</i> (GBLV)	Индийские летучие лисы (<i>Pteropus medius</i>) <i>Indian flying foxes (Pteropus medius)</i>	Шри-Ланка <i>Sri Lanka</i>	
<i>Lagos bat virus</i> (LBV)	Летучие мыши (<i>Pteropus</i> spp., <i>Saccolaimus albiventris</i>) <i>Bats (Pteropus spp., Saccolaimus albiventris)</i>	Африка (суб-Сахара) <i>Africa (sub-Saharan)</i>	II
<i>Mokola virus</i> (MOKV)	Неизвестен <i>Unknown</i>	Африка (суб-Сахара) <i>Africa (sub-Saharan)</i>	
<i>Shimoni bat virus</i> (SHIBV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Hipposideros commersoni</i>) <i>Insectivorous bats (Hipposideros commersoni)</i>	Кения <i>Kenya</i>	
<i>West Caucasian bat virus</i> (WCBV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Miniopterus</i> spp.) <i>Insectivorous bats (Miniopterus spp.)</i>	Юго-Восточная Европа <i>South-Eastern Europe</i>	Не определена <i>Not determined</i>
<i>Ikoma lyssavirus</i> (IKOV)	Неизвестен <i>Unknown</i>	Танзания <i>Tanzania</i>	
<i>Lleida bat lyssavirus</i> (LLEBV)	Обыкновенный длиннокрыл (<i>Miniopterus schreibersii</i>) <i>Bent-winged bat (Miniopterus schreibersii)</i>	Испания, Франция <i>Spain, France</i>	
<i>Kotalahti bat lyssavirus</i> (KBLV)	Ночница Брандта (<i>Myotis brandtii</i>) <i>Brandt's bat (Myotis brandtii)</i>	Финляндия <i>Finland</i>	Не имеет таксономического статуса <i>No taxonomic status</i>
<i>Taiwan bat lyssavirus</i> (TWBLV)	Восточный нетопырь (<i>Pipistrellus abramus</i>) <i>Japanese house bat (Pipistrellus abramus)</i>	Тайвань <i>Taiwan</i>	Не имеет таксономического статуса <i>No taxonomic status</i>

вируса (генетических конструкций) в процессе их размножения (репликации) и длительного культивирования.

Вирус бешенства относится к роду *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. Геном вируса представляет собой несегментированную одноцепочечную РНК отрицательной полярности длиной около 12 тыс. нуклеотидов, кодирующую пять белков: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L) [3].

Род *Lyssavirus* содержит 16 видов вируса бешенства, 13 из которых распределены по 2 филогруппам (табл. 1). Кроме того, выделены два изолята вируса бешенства, которые на момент подготовки статьи не имеют таксономического статуса — *Taiwan bat lyssavirus* (TWBLV) [7] и *Kotalahti bat lyssavirus* (KBLV) [8]. Первый обнаружен у двух восточных нетопырей (*Pipistrellus abramus*) в Тайване, второй — у ночницы Брандта (*Myotis brandtii*) в Финляндии. Все вирусы бешенства исходно были обнаружены у летучих мышей за исключением *Mokola lyssavirus* (MOKV) и *Ikoma lyssavirus* (IKOV), первичные хозяева которых пока не выявлены.

Подавляющее большинство случаев заболевания бешенством как человека, так и животных вызывается вирусами, относящимися к виду *Rabies virus* (RABV). Вирусы остальных видов либо обнаруживались лишь эпизодически у больных людей и наземных животных, либо найдены только у летучих мышей. Штаммы вирусов — SAD-Bern, SAD-B19, ERA, SAG, SAG2, Flury, Pitman Moore, — используемые для производства вакцин, также относятся к виду *Rabies virus* (RABV) [11].

Как и для других РНК-вирусов, геному вируса бешенства свойственна высокая эволюционная изменчивость. Это связано с тем, что вирусная РНК-полимераза не обладает корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активностью, что приводит к повышенному уровню возникновения нуклеотидных замен при репликации вирусного генома. Небольшие различия в нуклеотидных последовательностях отдельных представителей одного штамма могут быть обнаружены как для вирусов, выделенных из одного зараженного организма, так и выделенных из одного образца вакцины [11]. Частота возникновения спонтанных одонуклеотидных замен в случае вируса бешенства особенно высока в последовательности гена G ($21,9 \times 10^{-4}$ мутаций на основание). Для сравнения, в последовательности гена N эта частота значительно ниже — $(2,9-3,7) \times 10^{-4}$. Вероятно, повышенный уровень изменчивости гена G, кодирующего основной антиген, важен для вируса бешенства, помогая ему быстрее адаптироваться к различным хозяевам [12]. Таким образом, последовательность гена белка гликопротеина является высоковариабельной и может использоваться для контроля генетической стабильности. Кроме этого, белок гликопротеина содержит иммуногенные эпитопы, которые обеспечивают формирование иммунитета [13]. Нуклеотидная структура данных эпитопов известна [14], поэтому контроль генетической стабильности одновременно позволяет контролировать стабильность (сохранность, наличие) иммуногенных эпитопов.

Цель работы — исследование структуры производственного, рабочего посевного вируса бешенства штамма Внуково-32, используемого ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» для производства антирабической вакцины, его генети-

ческой стабильности на этапах производства, изучение возможности применения молекулярно-генетических методов для подтверждения подлинности производственного штамма в готовой форме вакцины и изучение нуклеотидной последовательности штамма CVS.

Материалы и методы

В исследовании были использованы производственный штамм Внуково-32, рабочие посевные вирусы № 26 и 28 (с разным количеством пассажей) и готовые серии вакцины антирабической 521, 962, 018 (серии были приготовлены в 2012, 2018, 2019 г.), штамм фиксированного вируса бешенства CVS, используемый для оценки специфической активности. Выделение вирусной РНК из указанных образцов, структура праймеров, использованных для реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), проведение реакции обратной транскрипции (ОТ), ПЦР описаны в приведенных ниже пунктах 1–4 соответственно. Анализ каждого из образцов проводился в трех повторях.

1. Подбор праймеров

Для определения вариабельных и консервативных участков генома вируса бешенства был проведен анализ первичной структуры полноразмерных последовательностей штаммов вирусов бешенства, представленных в GenBank. Это позволило произвести выбор нуклеотидных маркеров для подтверждения подлинности вакцинного штамма Внуково-32. На основании полученных данных проведен выбор области для амплификации и подбор праймеров. Расчеты проводили с использованием программного обеспечения Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen Corporation). Структура использованных в работе праймеров и их характеристика приведены в таблице 2.

При компьютерном анализе последовательности подобранных олигонуклеотидов они не образовывали стабильных вторичных структур в виде шпилек и термодинамически стабильных гомо- и гетеродимеров. Синтез праймеров был проведен в компании Синтол (Россия).

2. Выделение РНК и ОТ-ПЦР

Из 100 мкл препарата, содержащего штамм вируса бешенства Внуково-32 или штамм фиксированного вируса бешенства CVS, с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» (Ампли-Сенс®, ИнтерЛабСервис) выделяли РНК согласно инструкции производителя.

Для получения кДНК с использованием праймера RabF (табл. 2) и набора реагентов для ОТ (Синтол, Россия) на матрице вирусной РНК проводили реакцию ОТ. На первом этапе смешивали 2 мкл праймера RabF (10 пкмоль/мкл) с 6 мкл выделенной РНК и прогревали смесь при 95 °С 5 мин. Далее охлаждали пробирки при комнатной температуре 2 мин и добавляли 22 мкл смеси для ОТ (9 мкл деионизированной воды, 12 мкл 2,5-кратного буферного раствора для ОТ, 1 мкл MMLV-ревертазы) и инкубировали при 42 °С 30 мин. Для инактивации ревертазы смесь прогревали при 95 °С в течение 5 мин.

ПЦР на кДНК, полученной после ОТ, проводили в объеме 25 мкл с использованием праймеров RabF и RabR. ПЦР-смесь получали смешиванием по 1 мкл праймеров RabF

Таблица 2. Структура праймеров
Table 2. Primer structure

Праймер Primer	Структура Structure	Длина, п.н. Length, bp	Расчетная температура отжига, °С Estimated annealing temperature, °C
RabF	5' GG TAGTGGAGGACGAAGGATGC 3'	22	58,4
RabR	5' CGCAAGTCTCACTCCCTTTGGA 3'	22	60,1

GGTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGGTTCTCTACATGGAAGCTTAAAGTTGGATACATCTTAGCCA
TAAAAATGAACGGGTTTCACCTTGCACAGGCGTTGTGACGGAGGCTGAAAACCTACCTAACTTCGTTGGTTATGTCACA
ACCAGGTTCAAAAGAAAGCATTTCCGCCAACACAGATGCATGTAGAGCGCGGTACAACCTGGAAGATGGCCGGTG
ACCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTACCTGACTACAGCTGGCTTGAAGTGTAAAAACCAAGGAG
TCTCTCGTTATCATATCTCCAAGTGTAGCAGATTTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAGC
GGGAAGTGCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACACGATTACACCATTTGGATGCCCGAGAA
TCCGAGACTAGGGAAGTCTTGTGACATTTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAGACTTGGC

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность штамма Внуково-32. Фрагмент соответствует позициям 3458–3996 генома вируса бешенства. CAGCTG сайт рестрикции *PvuII*.

Fig. 1. The nucleotide sequence of the Vnukovo-32 strain. The fragment corresponds to positions 3458–3996 of the rabies virus genome. *PvuII* restriction site, CAGCTG.

(10 пкмоль/мкл), RabR (10 пкмоль/мкл), 10 мкл универсальной 2,5-кратной реакционной смеси для ПЦР (Синтол, Россия) и 8 мкл деионизированной воды с последующим добавлением 5 мкл кДНК. Амплификацию проводили по следующей программе: 95 °C — 1 мин 30 с; 40 циклов: 95 °C — 20 с, 55 °C — 15 с, 72 °C — 45 с; финальная элонгация 72 °C — 10 мин.

3. Секвенирование

Секвенирование ПЦР-продуктов с расчетной длиной 539 п.н. проводили на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (ABI, США) с использованием праймеров, использовавшихся для амплификации. Последовательность каждого фрагмента была расшифрована с прямого и обратного праймера, полученные первичные структуры проверены на отсутствие разночтений и полиморфизмов и объединены в программе Vector NTI 9.1 с помощью функции Contig Assembler.

4. Проведение ПДРФ¹

В реакцию рестрикции брали по 5 мкл смеси ПЦР после амплификации. Реакцию проводили эндонуклеазой рестрикции *PvuII* (ООО «СибЭнзим», Россия) в объеме 20 мкл в течение 1 ч согласно инструкции производителя. Продукты гидролиза разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия и визуализировали в УФ-свете.

Результаты и обсуждение

Определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена G из представленных образцов

Штамм Внуково-32. В результате исследования при амплификации РНК, выделенной из всех указанных образцов, включающих производственный штамм, рабочие посевные вирусы (№ 26, 28), готовые серии вакцины, были получены фрагменты с расчетной длиной 539 п.н. Нуклеотидная последовательность фрагментов всех образцов была идентична и представлена на рисунке 1.

Результаты секвенирования кДНК производственно-го штамма Внуково-32 представлены в GenBank (номер MN116503). В результате проведенного множественного выравнивания фрагментов гена G вируса бешенства штамма Внуково-32 (производственный штамм, рабочий посевной вирус, готовые серии вакцины) и ряда известных вакцинных штаммов (ERA, ERA-VC, SAG-2, SAD-B19, SAD-Bern) было показано отсутствие отличий в нуклеотидной последовательности штамма Внуково-32, полученной как из производственного штамма, рабочего посевного вируса, так и из готовых серий вакцины, выпущенных в разные годы. Это позволяет предполагать генетическую стабильность штамма Внуково-32, как минимум по изучаемому фрагменту, на разных этапах производства вакцины.

На основании полученных данных была составлена таблица 3, отображающая выявленные нуклеотидные различия в штаммах вируса бешенства (группа SAD).

Проведенный анализ показывает, что вакцинный штамм Внуково-32, используемый для производства, отличается от близких к нему штаммов, что позволяет проводить его идентификацию, исходя из нуклеотидного состава выбранной части генома. Анализ последовательностей штамма Внуково-32 и других вакцинных штаммов показал, что ген белка G штамма Внуково-32 содержит сайт рестрикции *PvuII* — CAGCTG. ДНК других штаммов не имеют такого сайта. В связи с этим появляется возможность подтверждения подлинности штамма Внуково-32 на всех этапах производства и в готовой форме вакцины с использованием молекулярно-генетических методов. Использование указанной рестриктазы позволяет гидролизовать амплифицированный фрагмент 539 п.н. с образованием двух фрагментов 276 и 263 п.н. В случае использования ПЦР-продукта, полученного на кДНК штамма Внуково-32, в агарозном геле результат гидролиза будет выглядеть одной выраженной полосой. В случае других штаммов (в нашем случае штамм CVS) реакция не пройдет, и фрагмент останется той же длины — 539 п.н. Результаты проведенного ПДРФ-анализа представлены на рисунке 2. При проведении гидролиза рестриктазой *PvuII* ПЦР-продукта, полученного на кДНК штамма CVS, в связи с отсутствием указанного сайта рестрикции у данного штамма реакция не прошла, в то время как у образцов, полученных на кДНК штамма Внуково-32, отмечается расщепление амплифицированного фрагмента с образованием 2 фрагментов примерно равной длины, в результате чего они визуализируются в виде одной полосы в районе 260–270 п.н.

Штамм CVS. В результате исследования при амплификации РНК, выделенной из 10% мозговой суспензии штамма фиксированного вируса бешенства CVS, получен фрагмент с расчетной длиной 539 п.н. Нуклеотидная последовательность штамма CVS представлена на рисунке 3.

Анализ нуклеотидной последовательности фиксированного вируса бешенства штамма CVS свидетельствует о том, что она полностью гомологична нуклеотидным последовательностям штаммов CVS, представленных в открытом доступе в GenBank. В базе данных GenBank представлены последовательности штаммов CVS, используемых разными исследовательскими группами.

По своей нуклеотидной последовательности штамм CVS вируса бешенства, используемый в ФГБУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» для контроля специфической активности, гомологичен последовательностям штаммов CVS, используемых в мире, и не содержит сайт рестрикции *PvuII*, характерный для штамма Внуково-32.

¹ ПДРФ — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

Таблица 3. Различающиеся нуклеотиды в изучаемом фрагменте гена G штамма Внуково-32, других вакцинных производных штаммов SAD и референсного штамма вируса бешенства RABV ref

Table 3. Differing nucleotides in the studied G gene fragment of the Vnukovo-32 strain, other vaccine derivatives of the SAD strain, and the RABV ref rabies virus reference strain

Штамм / Позиция в геноме Strain / Position in the genome	Vnuk 32	РПВ	ГСВ	ERA	ERA-VC	SAG-2	SAD-B19	SAD-Bern	RABV ref
3528	C	C	C	T	T	T	T	T	C
3539	A	A	A	A	A	G	G	A	A
3731	A	A	A	C	C	C	C	C	C
3732	G	G	G	G	G	G	G	G	A
3795	T	T	T	A	A	A	A	A	A
3839	A	A	A	A	A	A	A	A	G
3847	G	G	G	G	G	G	G	G	T
3918	A	A	A	A	A	A	A	G	A
3932	A	A	A	A	A	A	A	G	A
Число отличий от Vnuk 32 Number of differences from the Vnukovo-32 strain	—	—	—	3	3	4	4	5	5

Примечание. Серым фоном выделены нуклеотиды, отличающиеся от таковых в последовательности Внуково-32; позиции нуклеотидов даны по геномной последовательности референсного штамма вируса бешенства (RABV ref GenBank NC 001542). Vnuk 32 — производственный штамм Внуково-32 (GenBank MN116503); РПВ — рабочий посевной вирус; ГСВ — готовые серии вакцины антирабической 521, 962, 018.

«—» отличия не выявлены.

Note. Nucleotides that differ from those in the Vnukovo-32 sequence are highlighted in grey; nucleotide positions are given according to the genomic sequence of the rabies virus reference strain (RABV ref GenBank NC 001542). Vnuk32—production strain Vnukovo-32 (GenBank MN116503); РПВ—working virus seed; ГСВ—finished batches of the rabies vaccine 521, 962, 018.

— no differences identified.

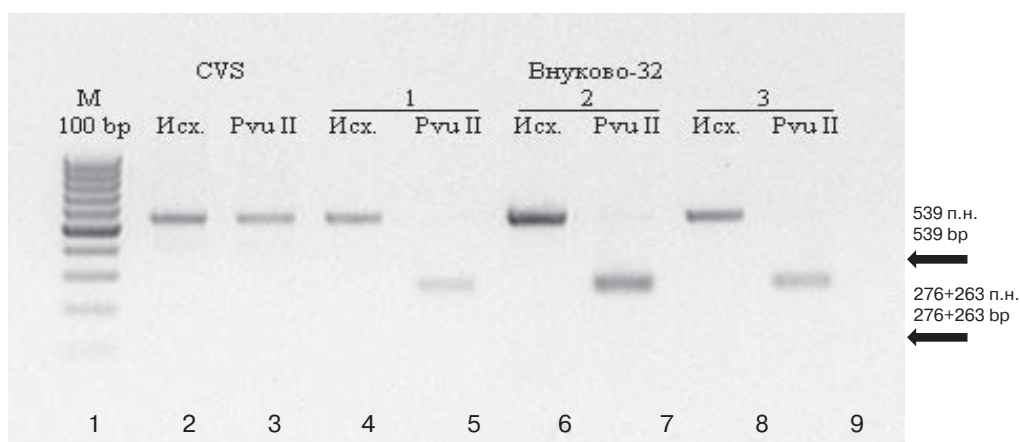


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов гидролиза рестриктазой *PvuII* ампликонов фрагмента гена G, полученных из различных образцов штаммов вируса бешенства. Дорожка 1 — М, маркер длин фрагментов ДНК (SE 100bp, НПО «СибЭнзим», М15); дорожки 2, 3 — штамм CVS: 2 — продукт амплификации до рестрикции *PvuII*, 3 — результат гидролиза *PvuII*; дорожки 4–9 — штамм Внуково-32; дорожки 4–5 — производственный штамм; 6–7 — серия вакцины 561; 8–9 — серия вакцины 962; 4, 6 и 8 — продукты амплификации до рестрикции *PvuII*; 5, 7 и 9 — результаты гидролиза *PvuII*.

Fig. 2. Electropherogram of the products of *PvuII* hydrolysis of the G gene fragment amplicons obtained from different samples of rabies virus strains. Lane 1—M, marker of DNA fragment length (SE 100 bp, Research, Development and Production Facility "SibEnzyme", M15); Lanes 2, 3—CVS strain: 2—amplification product before *PvuII* restriction, 3—result of hydrolysis by *PvuII*; Lanes 4–9—Vnukovo-32 strain; Lanes 4–5—production strain; Lanes 6–7—vaccine batch 561; Lanes 8–9—vaccine batch 962; Lanes 4, 6, and 8—amplification product before *PvuII* restriction; Lanes 5, 7, and 9—results of hydrolysis by *PvuII*.

GGTAGTGGAGGACGAAGGATGCAACCAACCTGTCCGAGTTCTCCTACATGGAACCTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCATCAAAGTGAAC-
GGGTTCACTTGCACAGGTGTTGTGACAGAGCCAGAGACCTACCAACTTTGTTGGTTATGTCACAACCACATTCAAGAGAAAGCATTT
CCGCCCCACCCSAGACGCATGTAGAGCCGCGTATAACTGGAAGATGGCCGGTGACCCSAGATATGAAGAGTCCCTACACAATCCATACCC
CGACTACCACTGGCTTCGAAGTGAAGAACCACCAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCAAGTGTGACAGATTTGGACCCATATGACAA
ATCCCTTCACTCAAGGGTCTTCCCTGGCGGAAATGCTCAGGAATAACGGGTGTCTCTACCTACTGCTCAACTAACCATGATTACACCAT
TGGATGCCGAGAATCCGAGACCAAGGACACCTTGTGACATTTTACCAATAGCAGAGGGAAGAGAGCAT**CCAAAGGGAGTGAGACTTGCG**

Рис. 3. Нуклеотидная последовательность штамма CVS. Фрагмент соответствует позициям 3458–3996 генома вируса бешенства (GenBank NC001542).

Fig. 3. The nucleotide sequence of the CVS strain. The fragment corresponds to positions 3458–3996 of the rabies virus genome (GenBank NC001542).

		10	20	30	40	50	60	70																			
																											
G_RV_Vnuk32	48	VVEDEGCTNLSGFSY	ME	LKVG	YI	SAIKMNGFTCTG	VVTEAET	YTNFVG	YVTTTFRK	KHFRPTPDACRAAY																	
G_ERA	48	VVEDEGCTNLSGFSY	ME	LKVG	YI	SAIKMNGFTCTG	VVTEAET	YTNFVG	YVTTTFRK	KHFRPTPDACRAAY																	
G_SAD-B19	48	VVEDEGCTNLSGFSY	ME	LKVG	YI	SAIKMNGFTCTG	VVTEAET	YTNFVG	YVTTTFRK	KHFRPTPDACRAAY																	
G_SAD-Bern	48	VVEDEGCTNLSGFSY	ME	LKVG	YI	SAIKMNGFTCTG	VVTEAET	YTNFVG	YVTTTFRK	KHFRPTPDACRAAY																	
G_RABVref	48	VVEDEGCTNLSGFSY	ME	LKVG	YI	SAIKMNGFTCTG	VVTEAET	YTNFVG	YVTTTFRK	KHFRPTPDACRAAY																	
		80	90	100	110	120	130	140																			
																											
G_RV_Vnuk32	118	NWK	MAGDPRY	EE	SLHN	PYPDY	SWL	RTV	KT	TKES	LV	IIS	PS	VAV	LD	PY	DR	SL	HS	RV	FP	SG	KC	SG	VAV	SSTY	
G_ERA	118	NWK	MAGDPRY	EE	SLHN	PYPDY	RWL	RTV	KT	TKES	LV	IIS	PS	VAD	LD	PY	DR	SL	HS	RV	FP	SG	KC	SG	VAV	SSTY	
G_SAD-B19	118	NWK	MAGDPRY	EE	SLHN	PYPDY	RWL	RTV	KT	TKES	LV	IIS	PS	VAD	LD	PY	DR	SL	HS	RV	FP	SG	KC	SG	VAV	SSTY	
G_SAD-Bern	118	NWK	MAGDPRY	EE	SLHN	PYPDY	RWL	RTV	KT	TKES	LV	IIS	PS	VAD	LD	PY	DR	SL	HS	RV	FP	SG	KC	SG	VAV	SSTY	
G_RABVref	118	NWK	MAGDPRY	EE	SLHN	PYPDY	SWL	RTV	KT	TKES	LV	IIS	PS	VAD	LD	PY	DR	SL	HS	RV	FP	SG	KC	SG	VAV	SSTY	
		150	160	170	180																						
																											
G_RV_Vnuk32	188	CST	NHD	YTI	WMP	EN	PRL	GMS	CDI	FTN	SRG	KR	ASK	G	SETC												
G_ERA	188	CST	NHD	YTI	WMP	EN	PRL	GMS	CDI	FTN	SRG	KR	ASK	G	SETC												
G_SAD-B19	188	CST	NHD	YTI	WMP	EN	PRL	GMS	CDI	FTN	SRG	KR	ASK	G	SETC												
G_SAD-Bern	188	CST	NHD	YTI	WMP	EN	PRL	GMS	CDI	FTN	SRG	KR	ASK	G	SETC												
G_RABVref	188	CST	NHD	YTI	WMP	EN	PRL	GMS	CDI	FTN	SRG	KR	ASK	G	SETC												

Рис. 4. Множественное выравнивание части белка G ряда штаммов группы SAD, кодируемых фрагментом вирусной РНК длиной 539 п.н. Черным фоном выделены аминокислотные остатки, отличающиеся от консенсусных, серым фоном — известные эпитопные участки белка G, расположенные на этом участке. Из рассмотрения удалены последовательности для штаммов ERA-VC и SAG-2, полностью совпадающие с последовательностями для штаммов ERA и SAD-B19 соответственно.

Fig. 4. Multiple alignment of a portion of protein G of a number of SAD strains encoded by a viral RNA fragment, 539 bp in length. The amino acid residues that differ from consensus amino acids residues are highlighted in black, known epitope regions of protein G located in this area are highlighted in grey. The sequences of ERA-VC and SAG-2 strains that coincide completely with the sequences of ERA and SAD-B19 strains, respectively, were excluded from the analysis.

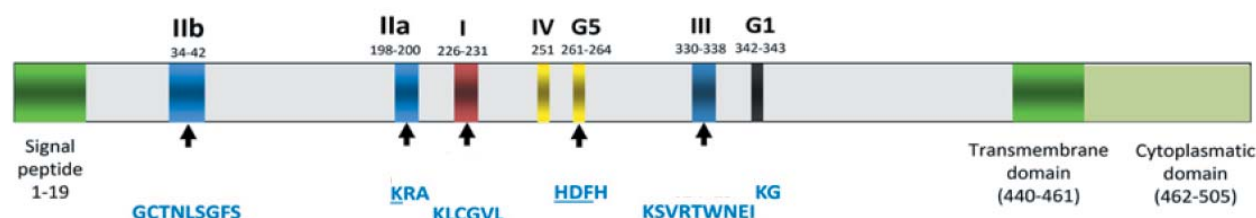


Рис. 5. Схематическое представление белка G вируса бешенства и расположение выявленных в нем эпитопных участков. Синим цветом указаны аминокислоты, соответствующие эпитопным участкам. Координаты участков приведены для зрелого белка (без учета участка сигнального пептида) (по N. A. Kuzmina [14] с изменениями).

Fig. 5. Schematic representation of the rabies virus protein G and location of identified epitope regions. The amino acids corresponding to the epitope regions are printed in blue. The coordinates of the regions are given for the mature protein (excluding the signal peptide region) (adapted from N. A. Kuzmina [14]).

Сравнение аминокислотных последовательностей, кодируемых фрагментом гена G, соответствующего позициям 3458–3996 генома вируса бешенства. Возможное влияние аминокислотных замен на антигенные свойства белка G

Для определения изменений в первичной структуре белка G, вызванных заменами нуклеотидов в изучаемом фрагменте гена белка G, было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, кодируемых этим фрагментом в выбранной группе геномов штаммов вируса бешенства (рис. 4).

Первичная структура участка белка G вируса бешенства штамма Внуково-32 содержит 3 аминокислотные замены по сравнению с консенсусными (наиболее часто встречающимися) аминокислотными остатками для вирусов всей группы SAD. Из них наиболее значимой является замена, приводящая к резкому изменению полярности аминокислотных остатков — D→V (позиция 113 в данном выравнивании).

Изучению антигенных свойств белка G вируса бешенства посвящены исследования, в которых были выявлены короткие участки этого белка, являющиеся антигенными детерминантами (эпитопами) для известных моноклональных антител к вирусу бешенства [14]. Полученные данные представлены в работе X. Liu с соавт. [6]. Обнаруженные к настоящему времени основные антигенные участки белка G вируса показаны на рисунке 5 [14].

Сравнение этих данных с выравниванием, приведенным на рисунке 4, показывает, что часть белка G, кодируемая изучаемым фрагментом 539 п.н., содержит два эпитопа (GCTNLSGFS и KRA; выделены на рис. 4 серым цветом фона). Эти последовательности белка G не содержат изменений ни у одного из рассмотренных штаммов. Таким образом, по имеющимся данным, белок G из штамма Внуково-32 содержит как минимум два неизмененных эпитопных участка, способных участвовать в выработке иммунного ответа у вакцинируемых. Все три наблюдаемые замены аминокислотных остатков расположены между двумя антигенными участками и, вероятно, не оказы-

вают существенного влияния на пространственную структуру белка и изменение его экспонируемых частей. К сожалению, трехмерная структура белка G вируса бешенства до сих пор не установлена, что не дает возможности определить экспонируемые части белка и положение в нем части, кодируемой фрагментом 539 п.н., более точно.

Выводы

1. Структура РНК вируса бешенства штаммов Внуково-32, CVS, кодирующая часть фрагмента белка G, соответствует аналогичному фрагменту РНК вируса бешенства.
2. Структура РНК штамма вируса бешенства Внуково-32, используемого в ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН», длиной 539 п.н., кодирующая фрагмент белка G, является стабильной на этапах производства.
3. В изученной части нуклеотидной последовательности штамм вируса бешенства CVS гомологичен нуклеотидным последовательностям штаммов вируса бешенства CVS, используемых в других странах.
4. Показана возможность применения рестрикционно-го анализа для подтверждения подлинности штамма Внуково-32 вируса бешенства на всех этапах производства, включая готовую форму вакцины.

Вклад авторов. Г. М. Игнатьев — идея и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов исследования; А. С. Оксанич — дизайн исследования, расчет праймеров, проведение секвенирования, анализ результатов исследования; Л. П. Антонова — проведение полимеразной цепной реакции, написание и доработка текста; Т. Г. Самарцева — проведение полимеразной цепной реакции, секвенирование; С. В. Мосолова — подготовка образцов штаммов вируса бешенства; К. М. Мефед — выделение РНК из образцов готовой формы вакцины, анализ результатов исследования; Л. В. Гмыль — обсуждение дизайна исследования, сравнение аминокислотных последовательностей, кодируемых фрагментом гена G, анализ результатов исследования; Н. А. Нетесова — дизайн исследования, проведение анализа первичной структуры полноразмерных последовательностей штаммов вирусов бешенства, выбор нуклеотидных маркеров.

Authors' contributions. Georgy M. Ignatyev—elaboration of the study idea and design, analysis and interpretation of the results; Aleksey S. Oksanich—elaboration of the study design, calculation of primers, performing sequencing, analysis of the results; Liliya P. Antonova—performing polymerase chain reaction, writing and editing of the text; Tatyana G. Samartseva—performing polymerase chain reaction and sequencing; Svetlana V. Mosolova—preparation of the samples of the rabies virus strains; Kirill M. Mefed—isolation of RNA from the finished dose form of the vaccine, analysis of the study results; Larisa V. Gmyl—discussion of the study design, comparison of the amino acid sequences encoded by the G gene fragment, analysis of the study results; Nina A. Netesova—elaboration of the study design, analysis of the primary structure of full-length sequences of the rabies virus strains, selection of nucleotide markers.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. Г. М. Игнатьев является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Georgy M. Ignatyev is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M, et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(4):e0003709. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003709>
2. Zhang Y, Zhang S, Li W, Hu Y, Zhao J, Liu F, et al. A novel rabies vaccine based on toll-like receptor 3 (TLR3) agonist PIKA adjuvant exhibiting excellent safety and efficacy in animal studies. *Virology*. 2016;489:165–72. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.029>
3. Ertl HCJ. New rabies vaccines for use in humans. *Vaccines*. 2019;7(2):54. <https://doi.org/10.3390/vaccines7020054>
4. Morimoto K, Shoji Y, Inoue S. Characterization of P gene-deficient rabies virus: propagation, pathogenicity and antigenicity. *Virus Res*. 2005;111(1):61–7. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.011>
5. Ito N, Sugiyama M, Yamada K, Shimizu K, Takayama-Ito M, Hosokawa J, et al. Characterization of M gene-deficient rabies virus with advantages of effective immunization and safety as a vaccine strain. *Microbiol Immunol*. 2005;49(11):971–9. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03692.x>
6. Liu X, Yang Y, Sun Z, Chen J, Ai J, Dun C, et al. A recombinant rabies virus encoding two copies of the glycoprotein gene confers protection in dogs against a virulent challenge. *PLoS One*. 2014;9(2):e87105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087105>
7. Hu SC, Hsu CL, Lee MS, Tu YC, Chang JC, Wu CH, et al. Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(4):782–5. <https://doi.org/10.3201/eid2404.171696>
8. Nokireki T, Tammiranta N, Kokkonen UM, Kantala T, Gadd T. Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland. *Transbound Emerg Dis*. 2018;65(3):593–6. <https://doi.org/10.1111/tbed.12833>
9. Amarasinghe GK, Ayllón MA, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Blasdel KR, et al. Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2019. *Arch Virol*. 2019;164(7):1967–80. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04247-4>
10. Picard-Meyer E, Beven V, Hirschaud E, Guillaume C, Larcher G, Robardet E, et al. Lleida Bat Lyssavirus isolation in *Miniopterus schreibersii* in France. *Zoonoses Public Health*. 2019;66(2):254–8. <https://doi.org/10.1111/zph.12535>
11. Geue L, Schares S, Schnick C, Kliemt J, Beckert A, Freuling C, et al. Genetic characterisation of attenuated SAD rabies virus strains used for oral vaccination of wildlife. *Vaccine*. 2008;26(26):3227–35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.007>
12. Kissi B, Badrane H, Audry L, Lavenue A, Tordo N, Brahimi M, et al. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. *J Gen Virol*. 1999;80(8):2041–50. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-8-2041>
13. Dietzgen RG, Kondo H, Goodin MM, Kurath G, Vasilakis N. The family *Rhabdoviridae*: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. *Virus Res*. 2017;227:158–70. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.010>
14. Kuzmina NA, Kuzmin IV, Ellison JA, Rupprecht CE. Conservation of binding epitopes for monoclonal antibodies on the rabies virus glycoprotein. *J Antivir Antiretrovir*. 2013;5(2):037–43.

Об авторах / Authors

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф. *Georgy M. Ignatyev*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Оксанич Алексей Сергеевич, канд. биол. наук. *Aleksey S. Oksanich*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Антонова Лилия Петровна. *Liliya P. Antonova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1221-1134>

Самарцева Татьяна Геннадьевна. *Tatyana G. Samartseva*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Мосолова Светлана Владимировна. *Svetlana V. Mosolova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9177-9712>

Мефед Кирилл Михайлович, канд. биол. наук. *Kirill M. Mefed*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7335-1982>

Гмыль Лариса Вениаминовна. *Larisa V. Gmyl*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1494-411X>

Нетесова Нина Александровна, д-р биол. наук. *Nina A. Netesova*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9896-5403>

Поступила 26.03.2020

После доработки 25.05.2020

Принята к публикации 27.05.2020

Received 26 March 2020

Revised 25 May 2020

Accepted 27 May 2020

Характеризация субстанции рекомбинантного эритропоэтина человека, полученной на основе штамма клеток яичника китайского хомячка CHOpe — продуцента эритропоэтина

И. Ф. Радаева*, В. А. Терновой, А. О. Семенцова, Н. Б. Думченко, Е. А. Нечаева

Федеральное бюджетное учреждение науки

«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

Разработка и внедрение в клиническую практику препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) продолжают оставаться актуальными в настоящее время. Для получения разрешения на проведение клинических исследований таблетированной формы рчЭПО для перорального применения проведены дополнительные исследования для подтверждения пригодности штамма-продуцента CHOpe для производства рчЭПО и соответствия характеристик субстанции требованиям, предъявляемым к ЭПО. **Цель работы:** характеристика субстанции рчЭПО, полученной на основе клеток штамма продуцента CHOpe, в соответствии с требованиями, предъявляемыми к ЭПО. **Материалы и методы:** субстанцию рчЭПО получали при культивировании штамма клеток яичника китайского хомячка CHOpe. Экспрессирующую конструкцию штамма-продуцента оценивали с помощью методов определения нуклеотидной и аминокислотной последовательностей. Секвенирование нуклеотидной последовательности, кодирующей ген ЭПО человека, проводили по методу Сэнгера. Аминокислотную последовательность С- и N-концов молекулы рчЭПО определяли методом Эдмана. Копийность гена ЭПО в клетках CHOpe определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Свойства субстанции рчЭПО изучали в соответствии с требованиями, предъявляемыми к ЭПО. Подлинность субстанции рчЭПО определяли с помощью методов изoeлектрического фокусирования, пептидного картирования и электрофореза в полиакриламидном геле. Для определения соотношения изоформного состава использовали метод капиллярного электрофореза. Для выявления примесей димеров и высокомолекулярных родственных веществ в субстанции применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления. Содержание белка и остаточных нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрическим методом. Концентрацию субстанции рчЭПО оценивали методом иммуноферментного анализа. **Результаты:** подтверждена генетическая стабильность штамма-продуцента CHOpe, доказана идентичность аминокислотной последовательности N- и С-концов молекулы рчЭПО природному ЭПО. На основе штамма-продуцента CHOpe получена субстанция рчЭПО, которая является гомогенной и не содержит примесей олигомерных форм ЭПО. Димеры и высокомолекулярные родственные вещества составляют менее 0,5%. Молекулярная масса рчЭПО находится в диапазоне значений от 32 до 38 кДа, изoeлектрическая точка — от 2,8 до 4,15. Идентифицированы пики изоформ 1–8, изоформный состав субстанции рчЭПО соответствует ЭПО. Установлено, что в 1 моль субстанции содержится 13,75 моль сиаловых кислот. **Выводы:** подтверждена пригодность штамма-продуцента CHOpe для производства рчЭПО. Полученная субстанция рчЭПО соответствует требованиям, предъявляемым к ЭПО.

Ключевые слова: продуцент эритропоэтина; штамм клеток CHOpe; нуклеотидная последовательность; молекулярная масса; подлинность; пептидное картирование; димеры; сиаловые кислоты

Для цитирования: Радаева ИФ, Терновой ВА, Семенцова АО, Думченко НБ, Нечаева ЕА. Характеризация субстанции рекомбинантного эритропоэтина человека, полученной на основе штамма клеток яичника китайского хомячка CHOpe — продуцента эритропоэтина. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):116–125. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-116-125>

Контактное лицо: Радаева Ирина Федоровна; radaeva@vector.nsc.ru

Characterisation of Recombinant Human Erythropoietin Obtained from CHOpe—Erythropoietin Producing Strain of Chinese Hamster Ovary Cells

I. F. Radaeva*, V. A. Ternovoy, A. O. Sementsova, N. B. Dumchenko, E. A. Nechaeva

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector",
Koltsovo, Novosibirsk Oblast 630559, Russian Federation

Development and implementation in clinical practice of recombinant human erythropoietins (rhEPOs) remain a priority task today. Additional studies were performed in order to obtain clinical trial authorisation for rhEPO tablets for oral use. The studies were aimed to demonstrate the suitability of the erythropoietin producer strain based on Chinese hamster ovary cells (CHOpe) for the production of rhEPO, and the compliance of the substance characteristics with the requirements for erythropoietin (EPO). **The aim of the study** was to characterise the rhEPO substance obtained from the CHOpe strain cells in accordance with the requirements for EPO. **Materials and**

methods: the rhEPO substance was obtained by culturing the strain of Chinese hamster ovary cells—CHOpe. The expression construct of the producer strain was evaluated using methods for determination of nucleotide and amino acid sequences. The Sanger method was used to perform sequencing of the nucleotide sequence encoding the human EPO gene. The amino acid sequences of the rhEPO molecule C- and N-termini were determined by the Edman method. The copy number of the EPO gene in CHOpe cells was determined by real-time polymerase chain reaction. The properties of the rhEPO substance were evaluated in accordance with the requirements for EPO. Isoelectric focusing, peptide mapping, and polyacrylamide gel electrophoresis were used for identification of the rhEPO substance. The ratio of isoform composition was determined by capillary electrophoresis. Dimer impurities and high molecular weight related substances were determined by high-pressure liquid chromatography. The content of protein and residual nucleic acids was determined by spectrophotometry. The concentration of the rhEPO substance was assessed by enzyme immunoassay. **The results of the study** confirmed genetic stability of the CHOpe producer strain and demonstrated identity of N- and C-terminal amino acid sequences of the rhEPO molecule to those of the natural EPO. The CHOpe producer strain was used to obtain a rhEPO substance which is homogenous and does not contain impurities of EPO oligomeric forms. Dimers and high molecular weight related substances account for less than 0.5%. The rhEPO molecular weight ranges from 32 to 38 kDa, and the isoelectric point is within 2.8–4.15. The study identified the peaks of isoforms 1–8, the isoform composition of the rhEPO substance corresponds to that of EPO. It was determined that 1 mol of the substance contains 13.75 mols of sialic acids. **Conclusions:** the study confirmed the suitability of the CHOpe producer strain for the production of rhEPO. The obtained rhEPO substance meets requirements for EPO.

Key words: erythropoietin producer; CHOpe cell strain; nucleotide sequence; molecular weight; identification; peptide mapping; dimers; sialic acids

For citation: Radaeva IF, Ternovoy VA, Sementsova AO, Dumchenko NB, Nechaeva EA. Characterisation of recombinant human erythropoietin obtained from CHOpe—erythropoietin producing strain of Chinese hamster ovary cells. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):116–125. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-116-125>

Corresponding author: Irina F. Radaeva; radaeva@vector.nsc.ru

Разработка и внедрение в клиническую практику препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) продолжают оставаться актуальными в настоящее время. Эритропоэтин (ЭПО) — гормон, контролирующий и регулирующий эритропоэз. ЭПО широко применяется в клинической практике при заболеваниях, сопровождающихся анемией [1–4]. В настоящее время существуют препараты рчЭПО в виде инъекционных форм для подкожного и внутривенного введения. Создание новой формы рчЭПО для перорального применения позволит решить ряд проблем, связанных с назначением и контролем приема препарата. Поскольку пероральная форма легко дозируется, это поможет избежать передозировки гормона при лечении и не потребует привлечения квалифицированного медицинского персонала, пациент самостоятельно сможет принимать препарат. Пероральная форма препарата позволит предотвратить как быструю инактивацию, так и резкое одномоментное повышение концентрации гормона в крови, а также снизить количество побочных эффектов.

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора был сконструирован штамм-продуцент рчЭПО [5]. Штамм клеток CHOpe депонирован в специализированную коллекцию перевиваемых соматических клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур (ИНЦ РАН) под номером ВСКК/П/626Д. Культура клеток не содержала посторонних агентов, являлась онкогенно безопасной, сохраняла стабильность биологических свойств в течение 20 последовательных пассажей. Созданы и заложены на хранение при температуре жидкого азота посевные и рабочие банки клеток CHOpe. Банки аттестованы в соответствии с национальными¹ и международными² требованиями Всемирной организации здравоохранения. Запаса клеток в банках достаточно для того, чтобы обеспечить в течение нескольких лет производство рчЭПО стандартным клеточным материалом [6].

На основе использования штамма-продуцента CHOpe разработана технология получения лиофилизированной субстанции рчЭПО [7]. Субстанция использовалась для создания таблетированной формы препарата, не имеющей мировых аналогов [8]. Таблетированная форма рчЭПО обладает выраженным стимулирующим действием на эритропоэз. Количественные характеристики эритропоэз-стимулирующих свойств инъекционной и таблетированной форм были сопоставимы. В ходе проведения доклинических исследований при однократном и повторном использовании препарата на лабораторных животных не наблюдались какие-либо токсические реакции, переносимость таблетированной формы рчЭПО была удовлетворительной [9].

При разработке таблетированной формы рчЭПО ряд свойств препарата остался неизученным. Поэтому при проведении доклинических исследований и подготовке документов для представления в Минздрав России с целью получения разрешения на проведение клинических исследований нами были проведены дополнительные исследования для подтверждения пригодности штамма-продуцента CHOpe для производства рчЭПО, а также субстанции рчЭПО требованиям, предъявляемым к ЭПО.

Цель работы — характеристика субстанции рчЭПО, полученной на основе штамма-продуцента CHOpe, в соответствии с требованиями, предъявляемыми к ЭПО.

Материалы и методы

Клетки CHOpe культивировали в стационарных условиях при температуре 37 °C в питательной среде Игла MEM (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), гипоксантина в концентрации 100 мкМ, аминоптерина — 20 мкМ и тимидина — 100 мкМ (Sigma-Aldrich, США). В качестве накопительной среды использовали 98% питательной среды Игла MEM и 2%

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

² Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks (WHO/BS/10.2132). WHO; 2010.

FetalClone II (HyClone, США). Каждые 3–4 сут проводили сбор культуральной жидкости (КЖ), содержащей рчЭПО. КЖ фильтровали через ацетатцеллюлозные мембраны с размерами пор 0,45 и 0,22 мкм (Merck Millipore, США) на установке УСФ-273 (НПП «Технофильтр», Россия). Далее КЖ концентрировали, используя разделительный ультрафильтрационный аппарат на полых волокнах AP-0,2н (НПП «Биотехпрогресс», Россия).

Выделение и очистку субстанции рчЭПО из концентрата КЖ проводили с использованием хроматографической системы АКТА Purifier (GE Healthcare, США). Очистка включала следующие стадии: хроматографию на имуносорбенте PC/ED7-Sepharose FF (ООО «Протеиновый контур», Россия), сорбенте Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, США) и гелефильтрацию на Sephacryl S-200 SF (GE Healthcare, США). Субстанцию рчЭПО пропускали через фильтры с размером пор 0,22 мкм (TPP, Швейцария) [7].

Секвенирование нуклеотидной последовательности фрагмента гена, кодирующего синтез ЭПО человека, интегрированного в ДНК клеток, проводили с помощью генетического анализатора 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Inc., США) по методу Сэнгера [10]. Для секвенирования использовали олигонуклеотиды (ООО «Биосинтез», Россия):

F527	AATGTCCTGCCTGGCTGTGG
R696	TCCCTGAAGCCCTGAGCGTG
R1837	TCATCTGTCCCCTGTCTCTGC
F1643	TTGCTAAGACTGTCCGTATCTTCCC

Аминокислотную последовательность C- и N-концов молекулы рчЭПО определяли на автоматическом газожидкостном секвенаторе PPSQ-31A (Shimadzu, Япония). Методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии идентифицировали фенилтиогидантоины аминокислот, полученные в каждом цикле секвенирования³.

Стабильность штамма-продуцента CHO⁺ подтверждали сравнением кодирующей части гена ЭПО с референсной последовательностью гена ЭПО человека после секвенирования фрагмента 1310 п.н. до и после культивирования клеток в течение 10 последовательных пассажей.

Копийность гена ЭПО в клетках CHO⁺ исследовали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). При помощи набора для выделения РНК/ДНК (НПФ «Литех», Россия) из 1×10⁶ клеток выделяли ДНК. Для постановки ПЦР использовали амплификатор CFX96 (Bio-Rad, США), праймеры и флуоресцентно-меченый зонд (ООО «Биосинтез», Россия):

F527	AATGTCCTGCCTGGCTGTGG
R696	TCCCTGAAGCCCTGAGCGTG
Proba	FAM-TATCACCTTCCCAGCACATTCCACAGA-BHQ1

В качестве положительного контрольного образца применяли рекомбинантную плазмиду pCR2.1-EP, содержащую вставку, идентичную участку гена, кодирующего ЭПО (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия). Отрицательным контролем служил TE(×1)-буфер.

Для определения аналитической чувствительности системы «праймеры—зонд» из растворов положительных контрольных

образцов готовили последовательные 10-кратные разведения. Определение концентрации ДНК в разведениях осуществляли при помощи коммерческого набора Quant-iTTM dsDNA Assay Kit, high sensitivity (InvitrogenTM, США) и флуориметра QUBIT (InvitrogenTM, США). Количество ДНК-матриц, детектируемое с применением праймеров и зондов, после оптимизации условий проведения реакции выражали в геномных эквивалентах в реакционной смеси. Электрофоретическую детекцию продуктов амплификации проводили в 2% агарозном геле, использовали системы видеодокументирования Molecular Imager[®] Gel DocTM XR System (Bio-Rad, США). После проведения ПЦР полученные фрагменты ДНК очищали, используя набор QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen[®], США), клонировали в плазмиду pCR2.1-EP. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе ABI Genetic 3130 XL (Applied Biosystems, Inc., США). Нуклеотидные последовательности гена ЭПО были взяты из базы данных GenBank [07q21/EPO] и проанализированы с использованием NCBI Mega BLAST.

Статистическую обработку полученного материала проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили при помощи приложения AlignX программного пакета Vector NTI 11 (Informax, США). В работе было использовано лицензионное программное обеспечение Microsoft Office Professional 2007 Win32, Vector NTI Suite 11, Lasergene 9 и BioEdit 7.1.3.0. Физико-химические свойства полученной субстанции рчЭПО определяли в соответствии с Европейской фармакопеей и Государственной фармакопеей Российской Федерации (ГФ РФ)⁴.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и приготвление геля проводили в соответствии с методикой, изложенной в ГФ РФ XIV издания⁵. В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор низкомолекулярных стандартных белков 94,0; 66,0; 45,0; 30,0; 20,1; 14,4 кДа (Amersham Bioscience, Швеция). Контролем служил стандарт ЭПО [R030] (ООО «Протеиновый контур», Россия).

Для проведения изoeлектрофокусирования использовали аппарат MultiphorTM II в комплекте с аппаратом для охлаждения и циркуляции жидкости, источник питания (Amersham Biosciences, Швеция), готовые гели (GE Healthcare, США). Для создания градиента pH в геле применяли амфолиты (pH 3,0–10,0) (Sigma-Aldrich, США) и амфолиты (pH 3,0–5,0) (Bio-Rad, США), для калировки геля — pI маркеры (pH 2,8–3,5–3,75–4,15–4,55–5,2–5,85–6,55) (GE Healthcare, США). Гель окрашивали 0,1% раствором кумасси бриллиантовый голубой (MP Biochemicals, Канада). В качестве контроля использовали Международный стандартный образец эритропоэтина (МСО ЭПО) BRP E1515000 (Sigma-Aldrich, США).

Пептидное картирование с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводили на хроматографе высокого давления Breeze Waters (Waters, США) с детектором поглощения в УФ-диапазоне при длине волны 214 нм, применяли колонку Symmetry 300 C4 (Waters, США)⁶.

Разделение изоформ рчЭПО проводили методом капиллярного электрофореза⁷. В качестве контроля использовали МСО ЭПО. Расчет процентного содержания изоформ проводили при помощи системы капиллярного электрофореза PA 800 plus (Beckman Coulter, США).

³ Erythropoietin Concentrated Solution. European Pharmacopoeia 7.0.

⁴ Erythropoietin Concentrated Solution. European Pharmacopoeia 7.0.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0016.18 Эритропоэтины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁵ Общая фармакопейная статья 1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁶ Erythropoietin Concentrated Solution. European Pharmacopoeia 7.0.

⁷ Там же.

GGTACCCCGCGCGCCCCAGGTGCTGAGGGACCCCGGCCAGGCGGGAGACGGTGAGTACTCGCGGGCTGGGCGCTCCCGCCGCCGGGTCC
CTGTTTGTAGCGCCCGGCTATTGGCCAGGAGGTGGCTGGGTTCAAGGACCGGCGACCCCGGAAGGGGGAGGGGGGTGGGCGAGCCTCCACGT
GCCAGCGGGGACTCTTGGGGATGGCAAAACCTGACCTGTGAAGGGACACAGTTTGGGGGTTAGGTTTGGGGGTTCTGCTGTGCCAGTGGAGA
GGAAGCTGATAAGCTGATATGGAGCCACCACTTATCTGCCAGAGGGGAAGCCTCTGTACACCAGGATTCCGAGAAGTGGATGCTGGTAGCTGGG
GGTGGGGTGTGCACACGGCAGCAGAGGGCCAGGGAGGCAGCACCTGAGTGTTCATGGTTGGGGACAGGAAGGACAGAGACGTGGGGATGAAG
GAAGCTGTCTTCCACAGCCACCCTTCTCCCACTCTCAGCCTGGCTATCTGTTCTAGAATGCTCTGCTGGCTGTGGCTTCCGTGTGCTCCCTCT
GGGCTCCAGTCTGCGGCGCCACCACGCTCACCAGTCTGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACCTTCCCA
GCACATCCACAGAACTCACGCTCAGGGCTTCAAGGAACTCCAGGAACCTGGCACTTGGTTTGGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGCCAGA
ATAAGTCTGGTGGCCCCAACCATACCTGGAACCTAGGCAAGGAGCAATCTACGGCTGTGGGCCAGGGCCAGGCCTTCAGGGACCCTTCACTC
CCGCACTTCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTGAATGAGAATATCACACCAAGTTAATTTCTATGCTTGAAGAGGATGGAGGTGAGTTC
CTTTTCTTTCTTTTGGAGAATCTCATTTGCGAGCCTGATTTGGATGAAAGGGAGGGAAAGGTAAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGG
CGCAGAGGCAATCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGAGAAATGCTTGAAGCCTGGAGTCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCCATCTCTACAA
ACATTTAAAAAATAGTGGTGCATGGTGGTAGTCCAGATATTTGGAAGGCTGAGGCGGGAGGACCAGGAATTTGAGGCTGCAGTGAGCTGTGA
TCACACCACTGCATCCAGCGAGTGAGGCCCTGTCTCAAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAATAATGAGGGTACATTATTATTCATCTCACTC
ACTCACTCATTATTATTCTCTTATTGCATACCTTCTGTTTGTCTGAGTCTGGTGTGGGCTGTGAGGAGAGGGTGACATGGGTGAGCTG
ACTCCAGAGTCCACTCCCTGTAGGTCCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGAAGCTGTCTGCGGTGTTGGTCAACTCTTCCC
AGCCGTGGGAGCCCTGCAGCTGCATGTGGATGTGGCCTTCGACGCTCACCCTCTGCTTGGGCTCTGGGAGCCAGGTGGACACTTCTGCTT
GCCCTTCTGTGAAGAAGGGGAGAAGGCTTGTCTAAGACTGTCGATCTCTCCCTTCTGTGGCACTGCAGCGACCTCTGTTTCAAGGAAGCC
ATCTCCCTCCAGATGCGGCTCAGTGTCTCACTCCGAACGACACTTCCGCAACTCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGAAATACAC
AGGGGAGGCTGCAGGACAAGGGGACAGATGACCAGGTGTGTCCATCCACCACCTCCCTCACCACATTGCTTGTGCCACACCTCCCCGCCAC
CGTCGAGGGGCTCTCAGCTCAGCCAGCTGTCCATGGACACTCCAGTGCATCTCAGGGGCCAGAGGAATGTGGAGAGGCAACTCTGAGATCT

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность, кодирующая ЭПО человека, в ДНК клеток CHOpe.
Fig. 1. The nucleotide sequence encoding human EPO integrated into the DNA of CHOpe cells.

Для выявления примесей димеров и высокомолекулярных родственных веществ в рчЭПО использовали метод ВЭЖХ. Хроматографию осуществляли на хроматографе высокого давления Breeze Waters (США) с детектором поглощения в УФ-диапазоне при длине волны 214 нм, применяли колонку Protein-Pak 125 (Waters, США), заполненную силикагелем гидрофильным для хроматографии, пригодным для фракционирования глобулярных белков с относительной молекулярной массой от 2 до 80000⁸.

Оценку сиаловых кислот проводили по методике, изложенной в Европейской фармакопее⁹. Для построения калибровочной кривой применяли стандартный раствор N-ацетилнейраминовой кислоты (Sigma-Aldrich, США). Используя калибровочную кривую, определяли содержание сиаловых кислот в рчЭПО, рассчитывали среднее количество молей сиаловых кислот на 1 моль ЭПО, допуская, что относительная молекулярная масса ЭПО равна 30600, а относительная молекулярная масса N-ацетилнейраминовой кислоты — 309.

Спектрофотометрическим методом определяли содержание остаточных нуклеиновых кислот¹⁰ в субстанции. Раствором сравнения служил буферный раствор, идентичный буферному раствору анализируемой пробы.

Концентрацию рчЭПО определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов PRoCop EPO2 (ООО «Протеиновый контур», Россия) и коммерческого набора реагентов Эритропоэтин-ИФА-Бест (Вектор-Бест, Россия). Диапазон измеряемых концентраций — 0–6,6 МЕ/мл, чувствительность анализа — 0,01 МЕ/мл.

Результаты и обсуждение

Культура клеток CHOpe состояла из субстратзависимых эпителиоподобных клеток. Клетки обеспечивали синтез и секрецию в культуральную жидкость (КЖ) рчЭПО [5].

Экспрессирующую конструкцию штамма-продуцента оценивали с помощью методов исследования нуклеотидной и аминокислотной последовательностей.

Секвенирование фрагмента гена ЭПО, интегрированного в ДНК клеток CHOpe (рис. 1), подтвердило полное соответствие структуре гена [07q21/EPO] ЭПО [11].

При определении аминокислотной последовательности N- и C-концов молекулы рчЭПО было показано, что N-концевая последовательность соответствует аминокислотам Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg, C-концевая последовательность — Thr-Gly-Glu-Ala-Cys-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg. Установленная аминокислотная последовательность N- и C-концов рчЭПО идентична последовательности природного ЭПО [10].

Стабильность продукции культуры клеток является фактором, отражающим стабильность амплифицированного состояния гена. Результаты исследований, подтверждающие стабильность штамма-продуцента CHOpe, были получены на основании сравнения кодирующей части гена ЭПО до и после культивирования клеток CHOpe в течение 10 последовательных пассажей. Нуклеотидная последовательность части гена ЭПО не содержала нуклеотидных замен (рис. 2).

В стабильных культурах клеток амплифицированные последовательности сохраняются в виде копий, интегрированных в хромосомы. Поскольку амплифицированный участок хромосомы имеет, как правило, большие размеры, его можно выявить при окрашивании хромосом, так как при этом образуются легко различимые гомогенно окрашенные районы. Ранее было показано, что кариотип культуры клеток CHOpe стабилен, соответствует виду и представляет собой производное от кариотипа китайского хомячка, маркерная хромосома содержит HSR гомогенно окрашенные участки, которые появляются в результате генной амплификации и ассоциируются с амплификацией встроенного гена и соответственно с усилением синтеза рекомбинантного белка [12, 13].

Генетическую стабильность штамма-продуцента CHOpe подтверждали исследованиями копииности гена. В результате проведенных исследований было установлено, что

⁸ Там же.

⁹ Там же.

¹⁰ Общая фармакопейная статья 1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Query	1	CTTCTCCTGTCCCTGCTGTCGCTCCCTCTGGGCTCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGC	60
Sbjct	5779	CTTCTCCTGTCCCTGCTGTCGCTCCCTCTGGGCTCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGC	5838
Query	61	CTCATCTGTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAAT	120
Sbjct	5839	CTCATCTGTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAAT	5898
Query	121	ATCACGGTGAGACCCCTTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTCAGGGCTTCAGGGA	180
Sbjct	5899	ATCACGGTGAGACCCCTTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTCAGGGCTTCAGGGA	5958
Query	181	ACTCCTCCAGATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTTGGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACAC	240
Sbjct	5959	ACTCCTCCAGATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTTGGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACAC	6018
Query	241	TGCCCCCTACATAAGAATAAGTCTGGTGGCCCCAAACCATACCTGGAACTAGGCAAGG	300
Sbjct	6019	TGCCCCCTACATAAGAATAAGTCTGGTGGCCCCAAACCATACCTGGAACTAGGCAAGG	6078
Query	301	AGCAAAGCCAGCAGATCCTACGGCCTGTGGGCCAGGGCCAGAGCCTTCAGGGACCCCTTGA	360
Sbjct	6079	AGCAAAGCCAGCAGATCCTACGGCCTGTGGGCCAGGGCCAGAGCCTTCAGGGACCCCTTGA	6138
Query	361	CTCCCGGGCTGTGTGCATTTTCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAAT	420
Sbjct	6139	CTCCCGGGCTGTGTGCATTTTCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAAT	6198
Query	421	ATCACTGTCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTGAGTTCC	480
Sbjct	6199	ATCACTGTCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTGAGTTCC	6258
Query	481	tttttttttttttttCCTTCTTTTGGAGAATCTCATTTCGAGCCTGATTTTGGATGAA	540
Sbjct	6259	TTTTTTTTTTTTTTTCTTCTTTTGGAGAATCTCATTTCGAGCCTGATTTTGGATGAA	6318
Query	541	AGGGAGAATGATCGAGGGAAAGGTAAAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGGCGCA	600
Sbjct	6319	AGGGAGAATGATCGAGGGAAAGGTAAAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGGCGCA	6378
Query	601	GAGGCTCAGCTCTATAATCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCT	660
Sbjct	6379	GAGGCTCAGCTCTATAATCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCT	6438
Query	661	GGAGTTTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCATCTCTACAAACATTTaaaa	720
Sbjct	6439	GGAGTTTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCATCTCTACAAACATTTAAAA	6498
Query	721	aaaTAGTCAGGTGAGGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATTTGGAAGGCTGAGGCGG	780
Sbjct	6499	AAATTAGTCAGGTGAGGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATTTGGAAGGCTGAGGCGG	6558
Query	781	GAGGATCGCTTGAGCCAGGAATTTGAGGCTGCAGTGAGCTGTGATCACACCACTGCACT	840
Sbjct	6559	GAGGATCGCTTGAGCCAGGAATTTGAGGCTGCAGTGAGCTGTGATCACACCACTGCACT	6618
Query	841	CCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCCCTGTCTCaaaaaagaaaaagaaaaaagaaaaTAAT	900
Sbjct	6619	CCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCCCTGTCTCAAAAAGAAAAGAAAAGAAAATAAT	6678
Query	901	GAGGGCTGTATGGAATAcattcattattcattcactcactcactcactcattcatt	960
Sbjct	6679	GAGGGCTGTATGGAATACATTCAATTATTCATTCACTCACTCACTCACTCACTCACT	6738
Query	961	cattcattcattcaACAAGTCTTATTGCATACCTTCTGTTTGTCTCAGCTTGGTGTGGG	1020
Sbjct	6739	CATTCACTTCAACAAGTCTTATTGCATACCTTCTGTTTGTCTCAGCTTGGTGTGGG	6798
Query	1021	GCTGCTGAGGGGCGAGGAGGAGGGTGACATGGGTGAGCTGACTCCCAGAGTCCACTCC	1080
Sbjct	6799	GCTGCTGAGGGGCGAGGAGGAGGGTGACATGGGTGAGCTGACTCCCAGAGTCCACTCC	6858
Query	1081	CTGTAGGTGCGGCGAGGAGGCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTCGGAAGCT	1140
Sbjct	6859	CTGTAGGTGCGGCGAGGAGGCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTCGGAAGCT	6918
Query	1141	GTCTGCGGGGCGAGGCGCTGTTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCTGCAGCTG	1200
Sbjct	6919	GTCTGCGGGGCGAGGCGCTGTTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCTGCAGCTG	6978
Query	1201	CATGTGGATAAAGCCGTCAAGTGGCCTTCGAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGA	1260
Sbjct	6979	CATGTGGATAAAGCCGTCAAGTGGCCTTCGAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGA	7038
Query	1261	GCCCAGGTG 1269	
Sbjct	7039	GCCCAGGTG 7047	

Рис. 2. Сравнение нуклеотидной последовательности части гена ЭПО до и после культивирования клеток CHOpe в течение 10 пассажей с референсной последовательностью гена ЭПО человека.
Fig. 2. Comparison of the nucleotide sequence of a fragment of the EPO gene before and after culturing CHOpe cells for 10 passages with the reference sequence of the human EPO gene.

в разведении 1:100 концентрация ДНК составила 0,18 пг/мл, или 972 молекулы. Таким образом, на 1000 клеток CHOpe приходится 972 копии гена ЭПО, или в среднем одна копия на клетку, что соответствует высокой генетической стабильности клеток.

По разработанной нами технологии была получена субстанция рчЭПО [7]. Известно, что физико-химические характеристики ЭПО определяют такие его свойства, как стабильность, активность, фармакокинетические и фармакодинамические характеристики, которые в конечном счете влияют на профиль безопасности и эффективности его применения [14]. Физико-химические свойства субстанции рчЭПО оценивали в соответствии с требованиями, изложенными в Европейской фармакопее¹¹.

По результатам проведенного гель-электрофореза субстанция рчЭПО гомогенна, представлена на электрофореграмме одной ярко выраженной широкой полосой, что свидетельствует об отсутствии примесей олигомерных форм ЭПО. Содержание мономера рчЭПО — не менее 95%. Молекулярная масса субстанции рчЭПО составляет 32–38 кДа, стандарт ЭПО (ООО «Протеиновый контур», Россия) имеет молекулярную массу 33–40 кДа (рис. 3). Молекулярная масса природного ЭПО составляет приблизительно 30,6 кДа, у коммерческих препаратов рчЭПО диапазон значений колеблется между 32 и 45 кДа.

Результаты изоэлектрического фокусирования представлены на рисунке 4. Субстанция рчЭПО содержит 4–5 основных полос в интервале значений pH от 2,8 до 4,15, что характерно для природного ЭПО.

При проведении специфической реакции расщепления трипсином полипептидной цепи ЭПО по остаткам аргинина и лизина профили хроматограмм гидролизатов субстанции рчЭПО и МСО ЭПО по количеству пиков и по времени удерживания должны принципиально совпадать, что и было доказано в результате проведенных исследований (рис. 5, 6).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов была подтверждена подлинность полученной субстанции рчЭПО.

Дальнейшие исследования состояли в определении соотношения изоформного состава субстанции рчЭПО. ЭПО является гетерогенным гликопротеином, его углеводная часть может меняться за счет нескольких вариантов гликозилирования, что и определяет наличие различных изоформ рчЭПО и соответственно различных качественных и количественных характеристик рчЭПО. Результаты анализа, полученные при разделении изоформ рчЭПО с помощью капиллярного электрофореза, представлены на рисунке 7. Базовая линия стабильна, с незначительным дрейфом. Показано, что на электрофореграмме определяется характерное расположение хорошо разделившихся пиков, идентифицированы пики изоформ 1–8. Изоформный состав рчЭПО соответствует изоформному составу МСО ЭПО.

Качественное и количественное распределение пиков изоформ рчЭПО совпало с распределением пиков МСО ЭПО. Содержание изоформ рчЭПО также соответствует требованиям, предъявляемым к ЭПО (табл. 1).

Согласно требованиям Европейской фармакопеи димеры и высокомолекулярные родственные вещества рчЭПО должны элюироваться перед появлением пика ЭПО, при этом общая площадь пиков, элюированных до основного пика, должна составлять не более 2% от общей площади всех пиков¹³. Про-

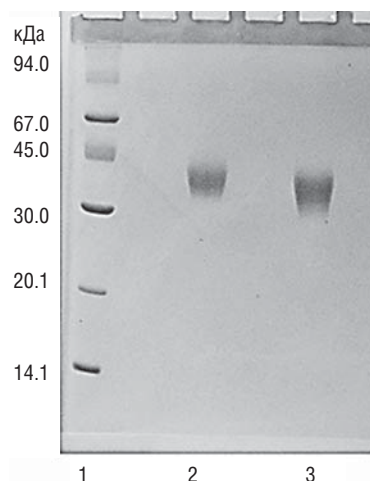


Рис. 3. Электрофореграмма субстанции рчЭПО (электрофорез в ПААГ в невосстанавливающих условиях в присутствии додецилсульфата натрия). (1) набор низкомолекулярных стандартных белков; (2) стандарт ЭПО; (3) рчЭПО.

Fig. 3. Electropherogram of the rhEPO substance (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis under non-reducing conditions). (1) set of low molecular weight reference proteins; (2) EPO reference standard; (3) rhEPO.

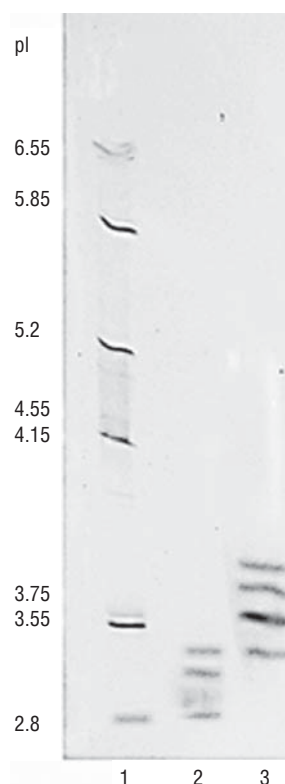


Рис. 4. Изоэлектрофореграмма субстанции рчЭПО. (1) набор pI маркеров; (2) МСО ЭПО; (3) рчЭПО. Анодный раствор — 0,1 М раствор серной кислоты, катодный раствор — 0,1 М раствор натрия гидроксида.

Fig. 4. Isoelectropherogram of the rhEPO substance. (1) set of pI markers; (2) EPO IRS; (3) rhEPO. 0.1 M sulfuric acid and 0.1 M sodium hydroxide were used as anodic and cathodic solutions, respectively.

¹¹ Erythropoietin Concentrated Solution. European Pharmacopoeia 7.0.

¹² Там же.

¹³ Там же.

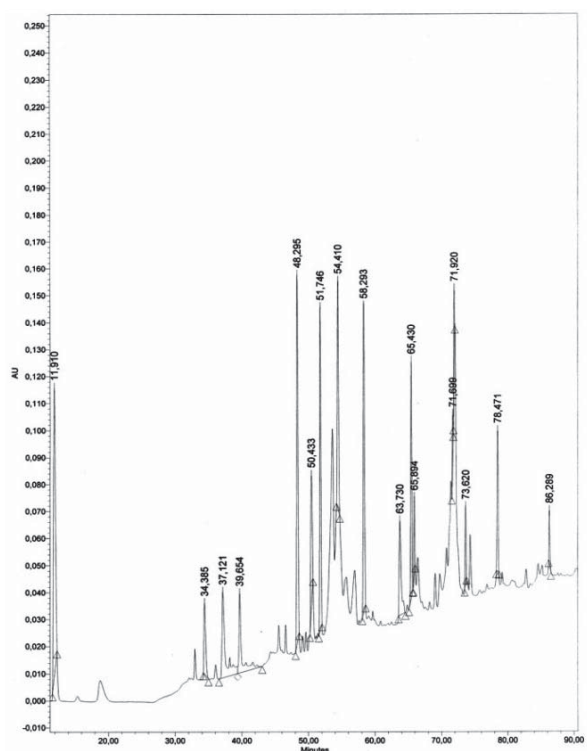


Рис. 5. Хроматограмма гидролизата субстанции рчЭПО. Детектирование: длина волны — 214 нм, объем пробы — 50 мкл, температура колонки — 25 °С.

Fig. 5. Chromatogram of the rhEPO hydrolysate. Detection: wavelength, 214 nm; injection volume, 50 μ L; column temperature, 25 °C.

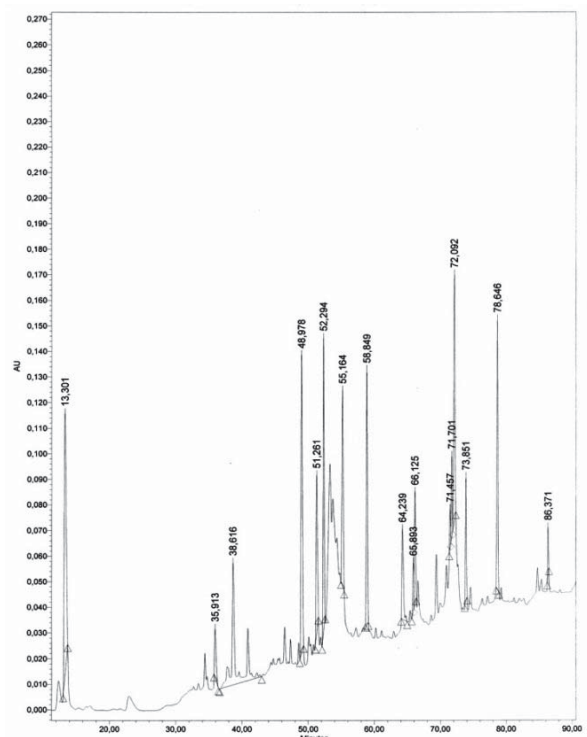


Рис. 6. Хроматограмма гидролизата МСО ЭПО. Детектирование: длина волны — 214 нм, объем пробы — 50 мкл, температура колонки — 25 °С.

Fig. 6. Chromatogram of the EPO IRS hydrolysate. Detection: wavelength, 214 nm; injection volume, 50 μ L; column temperature, 25 °C.

фили элюции, полученные в результате гель-фильтрации субстанции рчЭПО, представлены на рисунке 8.

Показано, что субстанция рчЭПО имеет чистоту 98–99%. Димеры и высокомолекулярные родственные вещества составляют менее 0,5%. Получение рчЭПО на основе перевиваемой культуры клеток должно быть основано на технологии, обеспечивающей высокую степень очистки от клеточных компонентов. Одним из критериев чистоты рчЭПО является отсутствие посторонних примесей, в частности остаточной ДНК клеток CHO⁺. Установлено, что отношение оптической плотности растворов для субстанции рчЭПО составляет 1,51–1,62 при критерии приемлемости более 1,5.

Особая роль в биологической активности ЭПО принадлежит сиаловым кислотам, которые являются терминальными остатками в олигосахаридах, связанными в качестве простетической группы с полипептидной цепью молекулы ЭПО, и обуславливают кислотные свойства гликопротеида. Количество сиаловых остатков в молекулах ЭПО неоднородно и может достигать 14, что составляет около 17% от всех углеводных компонентов в составе ЭПО [15, 16]. Количество сиаловых кислот (в пересчете на N-ацетилглюкозаминную кислоту) на 1 моль ЭПО должно составлять не менее 10 моль/1 моль. В результате проведенных исследований было установлено, что содержание сиаловых кислот в 1 моль субстанции рчЭПО соответствует требованиям, предъявляемым к ЭПО (табл. 2).

Концентрация рчЭПО в субстанции, определяемая методом иммуноферментного анализа, составляла 115000 $\pm$ 25000 МЕ/мл.

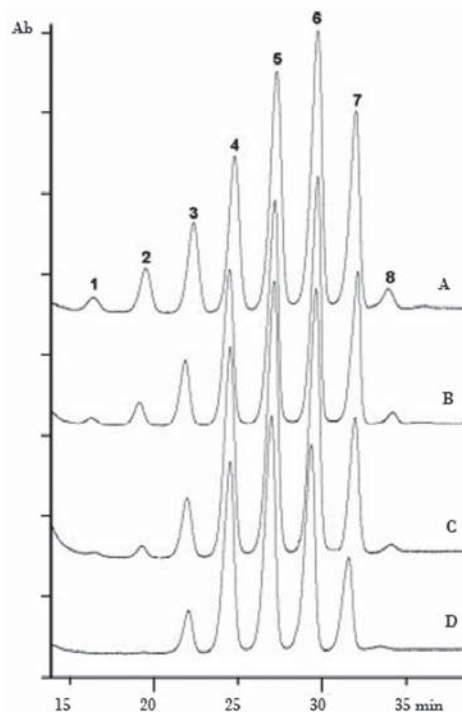


Рис. 7. Электрофореграмма субстанции рчЭПО. (А) МСО ЭПО, (В–Д) рчЭПО. Буферный раствор: 0,01 М раствор трицина, 0,01 М раствор натрия хлорида, 0,01 М раствор натрия ацетата, 7 М раствор мочевины, 2,5 мМ раствор путресцина. Детектирование: длина волны 214 нм. Длина капилляра — 70 см, объем пробы — 50 мкл, температура — 35 °С.

Fig. 7. Electropherogram of rhEPO. (A) EPO IRS, (B–D) rhEPO. Buffer solution: 0.01 M tricine, 0.01 M sodium chloride, 0.01 M sodium acetate, 7 M urea, 2.5 mM putrescine. Detection at 214 nm. Capillary, 70 cm; injection volume, 50 μ L, temperature, 35 °C.

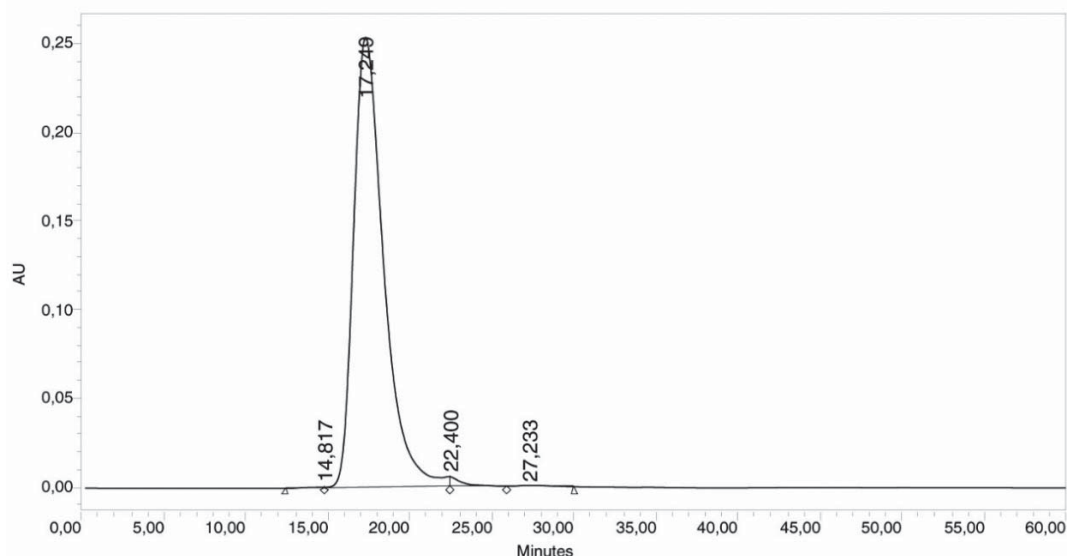


Рис. 8. Хроматограмма субстанции рчЭПО. Нагрузка на колонку — 20–30 мкг белка. Подвижная фаза — фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7,2). Скорость потока — 0,5 мл/мин. Детектирование: длина волны 214 нм, длительность хроматографирования не менее 1 ч.

Fig. 8. Chromatogram of rhEPO. Column load, 20–30 µg of protein. Mobile phase: phosphate-buffered saline, pH 7.2. Flow rate, 0.5 mL/min. Detection: wavelength, 214 nm; run time, not less than 1 hour.

Таблица 1. Содержание изоформ субстанции рчЭПО

Table 1. The content of rhEPO isoforms

Изоформы Isoforms	Содержание рчЭПО, % Content of rhEPO, %	Содержание МСО ЭПО, % Content of EPO IRS, %	Требования Европейской фармакопеи ¹² , содержание ЭПО, % Requirements of the European Pharmacopoeia ¹² , EPO content, %
1	Не более 5 Not more than 5	Не более 5 Not more than 5	0–15
2	Не более 5 Not more than 5	Не более 5 Not more than 5	0–15
3	9–10	10–12	1–20
4	15–20	15–20	10–35
5	10–15	10–15	15–40
6	30–33	34–35	10–35
7	20–23	23–25	5–25
8	Не более 5 Not more than 5	Не более 5 Not more than 5	0–15

Таблица 2. Определение сиаловых кислот в субстанции рчЭПО

Table 2. Determination of sialic acids in rhEPO

Наименование пробы Sample	Концентрация раствора N-ацетилнейраминной кислоты, мкг/мл N-acetylneuraminic acid solution concentration, µg/mL	Оптическая плотность (OD ₅₈₀) Absorbance (OD ₅₈₀)	Содержание сиаловых кислот, мкг Sialic acid content, µg	Среднее значение содержания сиаловых кислот, мкг Mean sialic acid content, µg	Количество молей сиаловых кислот на 1 моль рчЭПО и МСО ЭПО Moles of sialic acid per mole of rhEPO and EPO IRS
рчЭПО rhEPO	300	0,038	4,2	4,1	13,75
		0,036	4,0		
		0,038	4,2		
	150	0,021	2,1	2,2	
		0,023	2,3		
		0,021	2,1		
МСО ЭПО EPO IRS	300	0,030	3,2	3,5	11,2
		0,033	3,5		
		0,034	3,7		
	150	0,018	1,9	1,8	
		0,017	1,8		
		0,015	1,6		

Заключение

В результате исследований охарактеризована субстанция рчЭПО, полученная на основе штамма-продуцента CHOpe, в соответствии с требованиями, предъявляемыми к ЭПО. Подтверждена генетическая стабильность штамма-продуцента CHOpe, доказана идентичность аминокислотной последовательности ЭПО. На основе штамма-продуцента получена субстанция рчЭПО. Проведены исследования физико-химических свойств субстанции. Показано, что субстанция рчЭПО гомогенна и не содержит примесей олигомерных форм ЭПО, димеры и высокомолекулярные родственные вещества составляют менее 0,5%, молекулярная масса находится в узком диапазоне от 32 до 38 кДа. Изoeлектрическая точка — от 2,8 до 4,15. Идентифицированы пики изоформ 1–8, изоформный состав субстанции рчЭПО соответствует изоформному составу ЭПО. В 1 моль субстанции рчЭПО содержится 13,75 моль силовых кислот. Концентрация рчЭПО составляет 115000 МЕ/мл.

Вклад авторов. И. Ф. Радаева — получение данных по выделению и характеристике физико-химических показателей субстанции рчЭПО, анализ результатов, написание текста статьи; В. А. Терновой — исследование экспрессирующей конструкции штамма-продуцента CHOpe, анализ и оформление полученных результатов; А. О. Семенова — исследование экспрессирующей конструкции штамма-продуцента CHOpe, анализ и оформление полученных результатов; Н. Б. Думченко — получение данных по выделению субстанции рчЭПО, анализ результатов; Е. А. Нечаева — разработка дизайна исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions. Irina F. Radaeva—obtaining data on the isolation of the rhEPO substance and characterisation of its physico-chemical properties, analysis of the results, writing the text of the article; Vladimir A. Ternovoy—study of the expression construct of the CHOpe producer strain, analysis and presentation of the results; Aleksandra O. Sementsova—study of the expression construct of the CHOpe producer strain, analysis and presentation of the results; Natalya B. Dumchenko—obtaining data on the isolation of the rhEPO substance, analysis of the results; Elena A. Nechaeva—elaboration of the research design, writing the text of the article.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

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

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

Литература/References

1. Melli G, Jack C, Lambrinos GL, Ringkamp M, Höke A. Erythropoietin protects sensory axons against paclitaxel-induced distal degeneration. *Neurobiol Dis.* 2006;24(3):525–30. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.014>
2. Lisowska KA, Bryl E, Witkowski JM. Erythropoietin receptor is detectable on peripheral blood lymphocytes and its expression increases in activated T lymphocytes. *Haematologica.* 2011;96(3):e12–e13. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.038414>
3. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood.* 2003;102(4):1340–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0223>
4. Savino C, Pedotti R, Baggi F, Ubiali F, Gallo B, Nava S, et al. Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2006;172(1–2):27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.10.016>
5. Киприянов СМ, Царева АА, Офицеров ВИ, Хромых ТИ, Сандахчиев ЛС. Рекомбинантная плазмидная ДНК pSV-dEp-poly-NeO, кодирующая эритропоэтин человека, штамм культивируемых клеток яичника китайского хомячка CHOpe — продуцент эритропоэтина человека. Патент Российской Федерации № 2070931; 1996. [Kipriyanov SM, Tsareva AA, Ofitserov VI, Khromykh TI, Sandakhchiev LS. Recombinant plasmid DNA pSV-dEp-poly-NeO encoding human erythropoietin, strain of Chinese hamster ovary cultured cell CHOpe — a producer of human erythropoietin. Patent of the Russian Federation No. 2070931; 1996 (In Russ.)]
6. Радаева ИФ, Богрянцева МП, Нечаева ЕА. Банки культур клеток для биотехнологии. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2012;(2):110–5. [Radaeva IF, Bogryanceva MP, Nechaeva EA. Cell Culture Banks for Biotechnology. *Kletochnye tekhnologii v biologii i medicine = Cell Technologies in Biology and Medicine.* 2012;(2):110–5 (In Russ.)]
7. Радаева ИФ, Колесова МЕ, Сереброва ВС, Вараксин НА, Рябичева ТГ, Жилина НВ и др. Разработка технологии получения лиофилизованной субстанции рекомбинантного эритропоэтина человека. *Биотехнология.* 2013;29(2):67–73. [Radaeva IF, Kolesova ME, Serebrova VS, Varaksin NA, Ryabicheva TG, Zhilina NV, et al. Development of technology for production of recombinant human erythropoietin freeze-dried substance. *Biotechnologiya = Biotechnology.* 2013;29(2):67–73 (In Russ.)]
8. Сандахчиев ЛС, Колокольцова ТД, Костина НЕ, Нечаева ЕА, Юрченко НД, Рыжиков АБ и др. Таблетированная форма рекомбинантного человеческого эритропоэтина для перорального применения и способ ее получения. Патент Российской Федерации № 2152206; 2000. [Sandakhchiev LS, Kolokoltsova TD, Kostina NE, Nechaeva EA, Yurchenko ND, Ryzhikov AB, et al. Tableted form of recombinant human erythropoietin for oral use and method of its preparing. Patent of the Russian Federation No. 2152206; 2000 (In Russ.)]
9. Ханисов ВВ, Тритэк ВС, Акапов АБ, Буркитбаева СС, Джунушалиева ЧУ, Хасенбекова ЖР и др. Влияние субстанции рекомбинантного человеческого эритропоэтина на гематологические показатели в периферической крови. *Биотехнология. Теория и практика.* 2007;(2):101–8. [Hanisov VV, Tritek VS, Akapov AB, Burkitbaeva SS, Dzhunushalieva ChU, Hasenbekova ZhR, et al. The effect of the substance of recombinant human erythropoietin on hematological parameters in peripheral blood. *Biotechnologiya. Teoriya i praktika = Biotechnology. Theory and Practice.* 2007;(2):101–8 (In Russ.)]
10. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(12):5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
11. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82(22):7580–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.22.7580>
12. Малыгина ВС, Радаева ИФ, Нечаева ЕА, Дроздов ИГ. Изучение свойств культуры клеток CHOpe — продуцента эритропоэтина человека. *Биотехнология.* 2010;2:31–5. [Malygina VS, Radaeva IF, Nechaeva EA, Drozdov IG. Characteristics of a cell culture CHO-pe, a producer of human erythropoietin. *Biotechnologiya = Biotechnology.* 2010;2:31–5 (In Russ.)]
13. Nunberg JH, Kaufman RJ, Schimke RT, Urlaub G, Chasin LA. Amplified dihydrofolate reductase genes are localized to a homogeneously staining region of a single chromosome in a methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75(11):5553–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.11.5553>

14. Меркулов ВА, Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК и др. Препараты рекомбинантных эритропоэтинов и их характеристики. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2013;(3):4–11. [Merkulov VA, Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, et al. Recombinant erythropoietin preparations and their characteristics. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2013;(3):4–11 (In Russ.)]
15. Яковлев АК, Алешкин АВ, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018;63(7):422–8. [Yakovlev AK, Aleshkin AV, Merkulov VA, Bondarev VP. Improvement of erythropoietin bioassay. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2018;63(7):422–8 (In Russ.)]
16. Яковлев АК, Волкова РА, Симутенко ЛВ, Постнова ЕЛ, Батуашвили ТА, Воропаев АА и др. Разработка отраслевого стандартного образца специфической активности эритропоэтина. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(1):60–4. [Yakovlev AK, Volkova RA, Simutenko LV, Postnova EL, Batuashevili TA, Voropaev AA, et al. Development of industrial reference sample of the specific activity of erythropoietin. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* = *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(1):60–4 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-1-60-64>

Об авторах / Authors

Радаева Ирина Федоровна. Irina F. Radaeva. **SPIN-код РИНЦ:** 9236-9671

Терновой Владимир Александрович, канд. биол. наук. Vladimir A. Ternovoy, Cand. Sci. (Biol.). **SPIN-код РИНЦ:** 1328-5960

Семенцова Александра Олеговна. Aleksandra O. Sementsova. **SPIN-код РИНЦ:** 3387-9642

Думченко Наталья Борисовна. Natalya B. Dumchenko. **SPIN-код РИНЦ:** 2566-8337

Нечаева Елена Августовна, канд. мед. наук. Elena A. Nechaeva, Cand. Sci. (Med.). **SPIN-код РИНЦ:** 9270-8888

Поступила 16.01.2020

После доработки 15.05.2020

Принята к публикации 27.05.2020

Received 16 January 2020

Revised 15 May 2020

Accepted 27 May 2020

Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины бруцеллезной живой по показателю «Специфическая активность»

И. В. Касина*, С. А. Алексеева, Т. И. Немировская

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

Профилактическая иммунизация против бруцеллеза входит в Национальный календарь прививок по эпидемическим показаниям. Для иммунизации людей применяется живая вакцина, представляющая собой лиофилизированную взвесь вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 BA в стабилизирующей среде. В статье представлены результаты анализа качества 9 серий вакцины бруцеллезной живой, поступивших в Испытательный центр экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России для оценки соответствия препарата нормативным требованиям, а также анализ паспортных данных предприятия-производителя на эти серии. Необходимость проведения объективной экспертизы качества вакцины бруцеллезной, а также актуальность ее совершенствования не вызывают сомнений. **Цель работы:** оценка перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины бруцеллезной живой по показателю «Специфическая активность» (концентрация микробных клеток, количество живых микробных клеток, количество накожных доз). **Материалы и методы:** специфическую активность (концентрацию микробных клеток, количество живых микробных клеток) определяли визуальным и микробиологическим методами на образцах ОСО 42-28-396-2018 вакцины бруцеллезной серии 6 и на бактериальной взвеси вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 BA, полученного из АО «НПО «Микроген» в 2016 г. Количество накожных доз в вакцине бруцеллезной определяли расчетным методом. Статистическая обработка результатов была выполнена с помощью программы Microsoft Excel. **Результаты:** установлено несоответствие коэффициента концентрации бруцелл $1,7 \times 10^9$ м.к./мл по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ фактическим данным, полученным в результате проведенных исследований. Предварительный коэффициент концентрации бруцеллезного микроба по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ может достигать $3,0 \times 10^9$ м.к./мл. **Выводы:** полученные результаты могут послужить основанием для внесения изменения в паспорт и инструкцию по применению ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ по коэффициенту концентрации бруцеллезного микроба и в требования нормативной документации на вакцину бруцеллезную по показателю качества «Специфическая активность» (концентрация микробных клеток, количество живых микробных клеток, количество накожных доз). Для внесения соответствующих изменений по концентрации бруцелл, эквивалентной 10 МЕ, в паспорт и инструкцию по применению на ОСО мутности бактериальных взвесей (ОСО 42-28-85П) необходимо провести дополнительные испытания на других видах бруцелл.

Ключевые слова: вакцина бруцеллезная живая; вакцинный штамм *Brucella abortus*; специфическая активность; концентрация микробных клеток; количество живых микробных клеток; колониеобразующая единица (КОЕ); количество накожных доз; отраслевой стандартный образец (ОСО)

Для цитирования: Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины бруцеллезной живой по показателю «Специфическая активность». *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):126–135. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-126-135>

Контактное лицо: Касина Ирина Владимировна; kasina@expmed.ru

Prospects for Improving Quality Evaluation of the Live Brucellosis Vaccine in Terms of Specific Activity

I. V. Kasina*, S. A. Alekseeva, T. I. Nemirovskaya

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

Prophylactic immunisation against brucellosis is part of the National Immunisation Schedule for Epidemic Settings. The immunisation is performed with a live vaccine—a lyophilized suspension of the *Brucella abortus* strain 19 BA in a stabilizing medium. The paper presents the results of quality evaluation of 9 batches of live brucellosis vaccine that were submitted to the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation for assessment of the product's compliance with the established specifications. The paper also presents the results of evaluation of the passport information provided by the manufacturer for these batches. There is no doubt about the need for objective quality evaluation of brucellosis vaccines as well as about the significance of its improvement. **The aim of study** was to assess the prospects for improving

quality evaluation of live brucellosis vaccines in terms of Specific activity (concentration of microbial cells, number of living microbial cells, number of cutaneous doses). **Materials and methods:** specific activity (concentration of microbial cells and number of living microbial cells) was determined by visual and microbiological methods using the industrial reference standard of brucellosis vaccine OSO 42-28-396-2018, batch 6 and the bacterial suspension of the *Brucella abortus* strain 19 BA acquired from the joint stock company Scientific and Production Association "Microgen" in 2016. The number of cutaneous doses in the brucellosis vaccine was determined by the calculation method. Statistical processing of the results was performed using Microsoft Excel. **Results:** there was a mismatch between the brucella concentration coefficient of 1.7×10^9 microbial cells/mL determined by comparison with the industrial reference standard of bacterial suspension turbidity, 10 IU and the actual concentration of microbial cells obtained in the study. According to preliminary results, the brucella concentration coefficient corresponding to the industrial reference standard of bacterial suspension turbidity, 10 IU can reach 3.0×10^9 microbial cells/mL. **Conclusions:** the obtained results can serve as a basis for amending the data on the brucella concentration coefficient in the Passport and the Instructions for use of the industrial reference standard of bacterial suspension turbidity, 10 IU, as well as the Specific activity section (concentration of microbial cells, number of living microbial cells, number of cutaneous doses) of the established specifications for the brucellosis vaccine. Before amending the information on the brucella concentration corresponding to 10 IU in the Passport and the Instructions for use of the reference standard of bacterial suspension turbidity (OSO 42-28-85P), additional studies should be performed with other types of brucella.

Key words: live brucellosis vaccine; *Brucella abortus* vaccine strain; specific activity; concentration of microbial cells; number of living microbial cells; colony forming unit (CFU); number of cutaneous doses; industrial reference standard

For citation: Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. Prospects for improving quality evaluation of the live brucellosis vaccine in terms of Specific activity. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):126–135. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-126-135>

Corresponding author: Irina V. Kasina; kasina@expmed.ru

Эпидемическая обстановка по бруцеллезу на территории некоторых субъектов Российской Федерации продолжает оставаться неблагополучной и определяется наличием заболеваний среди мелкого и крупного рогатого скота, являющихся основными источниками инфекции для людей [1–3]. В многолетней динамике заболеваемость впервые выявленным бруцеллезом среди людей в Российской Федерации за последние 40 лет стабильно составляет 0,2–0,7% на 100 тыс. населения. Например, в 2018 г. в Российской Федерации зарегистрирован 291 случай бруцеллеза у людей, а в 2019 г. — 397 случаев, что сопоставимо со средними многолетними значениями. Наиболее неблагополучными территориями по бруцеллезу являются Северо-Кавказский, Южный и Сибирский федеральные округа¹. Профилактическая иммунизация против бруцеллеза входит в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям и проводится в соответствии с действующими нормативными актами в области иммунопрофилактики. Вакцинация проводится в очагах козье-овечьего типа следующим лицам, достигшим 18 лет: животноводов, ветеринарным работникам, зоотехникам, а также работникам бактериологических лабораторий, работающим с живыми культурами. Для иммунизации людей против бруцеллеза применяется живая вакцина, представляющая собой лиофилизированную взвесь вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 BA в стабилизирующей среде² [4, 5]. Необходимость проведения объективной экспертизы качества вакцины бруцеллезной, а также актуальность ее совершенствования не вызывают сомнений [6, 7].

Контроль качества вакцины бруцеллезной проводится с целью подтверждения соответствия показателей качества требованиям нормативной документации (НД)³. Вакцина исследуется

по физико-химическим показателям, таким как «рН», «Потеря в массе при высушивании», «Средняя масса и однородность по массе»; биологическим показателям — «Специфическая безопасность», «Иммуногенность» и микробиологическим показателям — «Подлинность», «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов», «Специфическая активность» (концентрация микробных клеток, количество живых микробных клеток, количество накожных доз), «Термостабильность».

Цель работы — оценка перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины бруцеллезной живой по показателю «Специфическая активность» (концентрация микробных клеток, количество живых микробных клеток, количество накожных доз).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- анализ результатов испытаний образцов вакцины бруцеллезной живой по показателям качества «Специфическая активность» с целью определения в вакцине общей концентрации, процента живых микробных клеток вакцинного штамма *B. abortus* 19-BA, а также количества накожных доз;
- определение оптимальной концентрации вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA в приготовленных микробных взвесах и в вакцине бруцеллезной, эквивалентной 10 МЕ ОСО мутности бактериальных взвесей (ОСО 42-28-85П) соответствующего года выпуска.

Материалы и методы

Материалы

- ОСО вакцины бруцеллезной живой (ОСО 42-28-396-2018), серия 6;
- производственный вакцинный штамм *B. abortus* 19 BA (дата лиофилизации — декабрь 2015 г.). Передан АО «НПО «Микроген»

¹ Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году». Роспотребнадзор; 2019. https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitarno_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf

² СП 3.1.7.2613-10 Профилактика бруцеллеза (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 26.04.2010 № 39).

³ Нормативная документация Р N003612/01-251217 Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения.

Фармакопейная статья 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.

в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов III–IV групп ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в 2016 г.;

- ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (ОСО 42-28-85П) соответствующего года выпуска;

- мясо-пептонный агар (МПА) с 0,5% глюкозы (рН 7,4) лабораторного приготовления;

- питательная среда для выделения и культивирования бруцелл сухая (Эритрит агар) серии МК040218, производства филиала АО «НПО «Микроген» в г. Махачкале НПО «Питательные среды» по ТУ 9398-046-14237183-07 (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/02098). Используемые питательные среды предусмотрены требованиями НД.

Все препараты применены в течение срока их годности.

В проведенном исследовании использованы результаты испытаний образцов серий бруцеллезной вакцины, поступивших в ИЦЭК МИБП для оценки соответствия препарата нормативным требованиям, и паспортные данные предприятия-производителя на эти серии.

Методы

Специфическую активность (концентрацию микробных клеток) определяли визуальным методом по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (ОСО 42-28-85П) соответствующего года выпуска. Общую концентрацию (ОК) бруцелл рассчитывали по формуле (1), указанной в НД и в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд.⁴ с использованием коэффициента концентрации бруцелл:

$$OK = (0,1 + n) \times 10 \times 1,7 \times 10^9, \quad (1)$$

где ОК — общая концентрация микробных клеток в 1 мл (м.к./мл); 0,1 — объем растворенной вакцины, мл; n — объем 0,9% раствора натрия хлорида, взятый для разведения пробы до ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, мл; 10 — постоянная величина (пересчет в 1 мл вакцины); $1,7 \times 10^9$ — концентрация микробных клеток в 1 мл для бруцелл, эквивалентная 10 МЕ.

Специфическую активность (количество живых микробных клеток) определяли микробиологическим методом (посев на питательные среды).

Тестируемые образцы, в которых определяли концентрацию микробных клеток, десятикратно разводили в 0,9% растворе натрия хлорида до концентрации 10^{-8} (условно посевная доза составляет десятки микробных клеток) и 10^{-9} (условно посевная доза составляет единицы микробных клеток) и высевали по 0,1 мл на 3 чашки Петри с питательным агаром. Посевы инкубировали в течение 5 сут при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

По окончании инкубации подсчитывали количество выросших колоний и вычисляли среднее количество для каждого разведения. Определяли среднее арифметическое из 2 разведений, рассчитывали количество живых бруцелл, содержащихся в 1 мл вакцины. Процентное содержание живых микробных клеток⁵ вычисляли для каждого образца вакцины, принимая за 100% число микробных клеток, исходя из показателя общей концентрации микробных клеток для данного образца по формуле (2):

$$\text{Процентное содержание живых м.к.} = \frac{BK}{OK} \times 100\%, \quad (2)$$

где БК — количество живых микробных клеток в 1 мл; ОК — общая концентрация микробных клеток.

Количество накожных доз определяли расчетным методом: полученное количество живых микробных клеток в ампуле делится на 10^{10} (количество живых микробных клеток в одной дозе)⁶.

Приготовление микробной взвеси вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА проводили по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ разными операторами и в разное время.

Для получения суспензии *B. abortus* 19 ВА в количестве условно 100 и 10 м.к. готовили бактериальную взвесь штамма по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ. Так как коэффициент концентрации бруцелл по ОСО мутности 10 МЕ составляет $1,7 \times 10^9$ м.к./мл, взвесь предварительно разводили в 0,9% растворе натрия хлорида до концентрации $1,0 \times 10^9$ м.к./мл в 1,7 раза ($1 + 0,7$). Затем проводили десятикратные разведения до 10^{-6} (1000 м.к.) и 10^{-7} (100 м.к.) и высевали по 0,1 мл на 3 чашки Петри с питательным агаром (посевная доза составила условно 100 и 10 м.к.).

Исследование бактериальной взвеси вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА по определению в ней количества живых микробных клеток в различных концентрациях проводили микробиологическим методом (метод посева на питательные среды) разными операторами в разное время. Для получения суспензии *B. abortus* 19 ВА в количестве 100 и 10 м.к. из разведений с шагом 0,5 (1,5; 2; 2,5; 3; 3,5) готовили взвесь штамма по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ и соответственно разводили ($1 + 0,5$; $1 + 1$; $1 + 1,5$; $1 + 2$; $1 + 2,5$). Затем проводили десятикратные разведения до условных 1000 и 100 м.к. и высевали на чашки Петри с питательным агаром (посевная доза условно составила 100 и 10 м.к.).

Проведен статистический анализ с использованием однофакторного дисперсионного анализа для группы разведений и с помощью критерия Стьюдента для попарного сравнения разведений. С помощью программы Microsoft Excel проведен дисперсионный анализ статистической значимости отличий исследованных разведений.

Результаты и обсуждение

Показатель качества «Специфическая активность» вакцин бруцеллезной живой, как и для ряда других живых бактериальных вакцин, оценивается по общей концентрации и количеству живых микробных клеток производственного вакцинного штамма. По результатам оценки качества данного показателя, то есть по фактическому содержанию живых микробных клеток, определяется количество прививочных доз в ампуле.

Общая концентрация микробных клеток в живой бруцеллезной вакцине, содержащей как живые, так и неживые микробные клетки, определяется визуально по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ и затем рассчитывается по формуле с использованием коэффициента концентрации бруцелл ($1,7 \times 10^9$ м.к./мл). В соответствии с НД в вакцине должно содержаться от 4×10^{10} до 10×10^{10} м.к./мл, при этом содержание живых микробных клеток должно составлять не менее 60%.

Нами проведен анализ результатов испытаний 9 серий вакцины бруцеллезной живой разных лет выпуска (с 2012 по 2020 г.) по паспортным данным предприятия-производителя и в Испытательном центре экспертизы качества МИБП (ИЦЭК МИБП) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по показателям качества «Специфическая активность» (концентрация микроб-

⁴ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁵ Фармакопейная статья 3.3.1.0011.15 Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и на кожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁶ Там же.

ных клеток, количество живых микробных клеток, количество накожных доз).

При контроле вакцины бруцеллезной живой на предприятии-производителе общая концентрация микробных клеток в 1 мл по всем сериям составила $(7,1 \pm 0,8) \times 10^{10}$, из них количество живых микробных клеток — $(9,3 \pm 1,1) \times 10^{10}$, т. е. условно высевали 71 и 7 микробных клеток, а фактически выросло на питательной среде — 93 и 9 КОЕ (табл. 1). Соответственно согласно расчету количество живых микробных клеток в вакцине составило 132 $\pm$ 19% от общей концентрации. Также из анализа результатов испытаний бруцеллезной вакцины в ИЦЭК МИБП (табл. 1) следует, что общая концентрация микробных клеток в 1 мл составила $(7,2 \pm 0,6) \times 10^{10}$, из них количество живых микробных клеток — $(7,8 \pm 1,1) \times 10^{10}$, т. е. посевные дозы по расчетному количеству содержали 72 и 7 микробных клеток, а фактически выросло на питательной среде — 78 и 8 КОЕ. В процентном содержании количество КОЕ составило $110 \pm 18\%$ от общей концентрации.

Анализ результатов испытаний вакцины на предприятии-производителе и в ИЦЭК МИБП показал, что полученное при посеве количество живых микробных клеток в образцах вакцины достигало 100% или значительно превышало общую концентрацию микробных клеток, определенную по ОСО мутности 10 МЕ. Результаты противоречат как математическим, так и биологическим принципам.

Важно отметить, что количество прививочных доз в вакцине, а также иммунизирующая доза для лабораторных животных при испытании по показателю «Иммуногенность» определяется из фактического содержания живых микробных клеток в ампуле. В связи с этим установленное количество прививочных доз в вакцине всегда соответствовало требованиям НД (табл. 1) и было в пределах от 4 до 10 доз в ампуле.

При испытании жизнеспособности вакцины проводится контроль чувствительности используемых питательных сред. При посеве 10 м.к. из взвеси штамма *B. abortus* 19 BA, приготовленной по ОСО мутности 10 МЕ, должен наблюдаться рост единичных колоний. В результате контроля чувствительности питательных сред (табл. 2) было выявлено несоответствие количества выросших колоний вакцинного штамма из посевной дозы. При посеве условно 10 м.к. штамма *B. abortus* 19 BA наблюдался рост на плотной питательной среде в количестве 19 ± 3 КОЕ.

Таким образом, из анализа результатов экспертизы качества вакцины и контроля чувствительности питательных сред следует, что, по нашим предварительным данным, коэффициент концентрации бруцелл не соответствует заявленной в инструкции по применению на ОСО мутности 10 МЕ концентрации $1,7 \times 10^9$ м.к./мл.

Для подтверждения полученных результатов нами были проведены дополнительные исследования посевов бактериальной взвеси вакцинного штамма, приготовленной по ОСО мутности 10 МЕ, разными операторами и в разное время (табл. 3). Установлено, что фактический рост бруцелл значительно превышал расчетную посевную дозу. Так, при посеве условно 10 м.к. на плотной питательной среде было выявлено 19 ± 5 КОЕ, при посеве 100 м.к. — 172 ± 34 КОЕ. Полученные результаты подтвердили несоответствие коэффициента концентрации бруцелл по ОСО мутности 10 МЕ значению $1,7 \times 10^9$ м.к./мл.

Результаты исследований стали основанием для определения оптимальной концентрации бруцелл, соответствующей ОСО мутности 10 МЕ. Для этого были проведены посеvy вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA в количестве условных 100 м.к. из бактериальной взвеси, приготовленной по ОСО мутности и разведенной в 1,5; 2; 2,5; 3 и 3,5 раза (с шагом 0,5). Наиболее близким к посевной дозе 100 м.к. установлено значение 91 ± 22 КОЕ (табл. 4), которое соответствует предваритель-

ному разведению в 2,5 раза ($1 + 1,5$). Однако бактериальная взвесь содержит как живые, так и неживые микробные клетки. Поэтому концентрация микробной взвеси бруцелл, оптимально соответствующая количеству живых микробных клеток из посевной дозы, была получена при разведении микробной взвеси в 3 раза. При посеве вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA из бактериальной взвеси, содержащей условно 100 м.к., наблюдался рост, соответствующий значению 65 ± 13 КОЕ.

Для выбора разведения, которое могло бы служить предполагаемым коэффициентом концентрации бруцелл, соответствующего ОСО мутности 10 МЕ, провели оценку статистической значимости различий средних значений выросших колоний. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа для группы разведений и с помощью критерия Стьюдента для попарного сравнения разведений (табл. 4, 5). Проведенный с помощью программы Microsoft Excel дисперсионный анализ статистической значимости отличий исследованных разведений показал, что для групп разведений в 1,5, 2 и 2,5 раза различия полученных средних значений КОЕ (143 ± 32 ; 116 ± 23 ; 91 ± 22) статистически незначимы ($p = 0,057$), так как значение критерия $F_{расч}$, равное 3,98, меньше, чем $F_{кр}$, равное 4,26. Далее провели попарный анализ разведения 3 в сравнении с разведениями 1,5; 2; 2,5 и 3,5, а также разведения 3,5 с разведениями 1,5; 2; 2,5 и 3 (табл. 4, 5). Различия средних значений КОЕ (65 ± 13 и 44 ± 10), полученных при высеве из разведений 2,5 и 3 соответственно, оказались статистически незначимы. Статистически значимо отличается от остального среднего значения 44 ± 10 КОЕ, полученного при посеве разведения в 3,5 раза.

Таким образом, необходимое разведение может находиться в диапазоне от 1,5- до 3-кратного первоначального разведения. Дальнейшие исследования проводили с максимальным первоначальным разведением в 3 раза.

Для подтверждения предполагаемого коэффициента концентрации бруцелл по ОСО мутности 10 МЕ 3×10^9 м.к./мл нами были проведены дополнительные посеvy штамма *B. abortus* 19 BA в количестве условно 10 и 100 м.к. из бактериальной взвеси, приготовленной по ОСО мутности 10 МЕ и разведенной в 3 раза, разными операторами и в разные дни (табл. 6). При посеве условных 10 м.к. вакцинного штамма наблюдался рост на питательной среде в количестве 8 ± 2 КОЕ, а при посеве 100 м.к. — 80 ± 17 КОЕ.

Поскольку метод определения концентрации микробных клеток визуальный, зависит от индивидуальных особенностей оператора, соответственно и результаты несколько разнятся. Тем не менее анализ полученных результатов показал, что количество выросших колоний, выявленных каждым оператором, не превышают посевную дозу.

Также для подтверждения предварительной оптимальной концентрации бруцелл по ОСО мутности 10 МЕ, эквивалентной 3×10^9 м.к./мл, были проведены посеvy 20 образцов ОСО вакцины бруцеллезной живой (табл. 7).

При сравнительном посеве условных 10 и 100 м.к. из бактериальной взвеси вакцины, приготовленной по ОСО мутности 10 МЕ и эквивалентной концентрации бруцелл $1,7 \times 10^9$ м.к./мл, выросло на питательной среде соответственно 13 ± 4 и 118 ± 29 КОЕ вакцинного штамма. Из взвеси, приготовленной по ОСО мутности 10 МЕ и эквивалентной предполагаемой нами концентрации бруцелл 3×10^9 м.к./мл, в среднем выявлен рост, соответствующий значениям 7 ± 2 и 72 ± 11 КОЕ. Данные результаты показали, что оптимальное соотношение выросших колоний от посевной дозы получено из взвеси, эквивалентной по ОСО мутности 10 МЕ с коэффициентом бруцелл 3×10^9 м.к./мл. Таким образом, наши предварительные результаты показывают, что концентрация

Таблица 1. Результаты испытания вакцины бруцеллезной живой по показателю «Специфическая активность» (общая концентрация микробных клеток, количество живых микробных клеток, количество накожных доз) на производстве (данные паспорта) и в ИЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России с 2012 по 2020 г.

Table 1. Results of specific activity testing (total concentration of microbial cells, number of living microbial cells, number of cutaneous doses) of the live brucellosis vaccine during production (passport information) and by the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation (TCEMPQ) from 2012 to 2020

Период испытания Time period	Место испытания Facility	Общая концентрация м.к./мл по ОСО мутности бак- териальных взвесей 10 ME Total concentration, micro- bial cells/mL, according to the reference standard of bacterial suspension turbidity, 10 IU	Количество живых микробных клеток Number of living microbial cells	Процент живых микробных клеток Percent of living microbial cells	Коли- чество накожных доз Number of cutane- ous doses
2012	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	$7,2 \times 10^{10}$	$9,9 \times 10^{10}$	137	10
	ИЦЭК МИБП TCEMPQ	$8,1 \times 10^{10}$	$7,9 \times 10^{10}$	98	8
2013	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	$7,6 \times 10^{10}$	$10,4 \times 10^{10}$	137	10
	ИЦЭК МИБП TCEMPQ	$7,6 \times 10^{10}$	$7,4 \times 10^{10}$	98	7
2015	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	$7,4 \times 10^{10}$	$7,0 \times 10^{10}$	95	7
	ИЦЭК МИБП TCEMPQ	$7,2 \times 10^{10}$	$7,0 \times 10^{10}$	98	7
2016	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	$8,0 \times 10^{10}$	$9,1 \times 10^{10}$	113	9
	ИЦЭК МИБП TCEMPQ	$8,0 \times 10^{10}$	$8,0 \times 10^{10}$	100	8
2016	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	$8,0 \times 10^{10}$	$9,0 \times 10^{10}$	112	9
	ИЦЭК МИБП TCEMPQ	$6,8 \times 10^{10}$	$9,3 \times 10^{10}$	144	9
2017	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	$5,5 \times 10^{10}$	$8,3 \times 10^{10}$	151	8
	ИЦЭК МИБП TCEMPQ	$6,6 \times 10^{10}$	$7,5 \times 10^{10}$	113	8
2018	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	$7,0 \times 10^{10}$	$10,0 \times 10^{10}$	143	10
	ИЦЭК МИБП TCEMPQ	$7,0 \times 10^{10}$	$6,4 \times 10^{10}$	91	6
2019	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	$6,4 \times 10^{10}$	$9,8 \times 10^{10}$	153	10
	ИЦЭК МИБП TCEMPQ	$6,7 \times 10^{10}$	$7,4 \times 10^{10}$	111	7
2020	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	$6,9 \times 10^{10}$	$10,2 \times 10^{10}$	148	10
	ИЦЭК МИБП TCEMPQ	$7,0 \times 10^{10}$	$9,7 \times 10^{10}$	139	10
$X_{cp} \pm S$	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	$(7,1 \pm 0,8) \times 10^{10}$	$(9,3 \pm 1,1) \times 10^{10}$	132 ± 19	9 ± 1
	ИЦЭК МИБП TCEMPQ	$(7,2 \pm 0,6) \times 10^{10}$	$(7,8 \pm 1,1) \times 10^{10}$	110 ± 18	8 ± 1

Таблица 2. Чувствительность питательных сред при посеве взвеси вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA, приготовленной по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, эквивалентной $1,7 \times 10^9$ м.к./мл

Table 2. Sensitivity of the culture media following the seeding of the *B. abortus* 19 BA suspension prepared based on the industrial reference standard of bacterial suspension turbidity, 10 IU, with the concentration equivalent to 1.7×10^9 microbial cells/mL

Период испытания Time period	Количество выросших колоний штамма <i>B. abortus</i> 19 BA при посеве ~10 м.к. Number of colonies grown from the <i>B. abortus</i> 19 BA strain following the seeding of ~10 microbial cells			
	Чашка Петри 1 Petri dish 1	Чашка Петри 2 Petri dish 2	Чашка Петри 3 Petri dish 3	$X_{cp} \pm S$
2012	15	19	21	18 ± 3
2013	15	19	17	17 ± 2
2015	17	23	20	20 ± 3
2016	19	20	17	19 ± 2
2016	13	15	16	15 ± 2
2017	16	17	21	18 ± 3
2018	22	30	25	26 ± 4
2019	18	15	19	17 ± 2
2020	17	23	23	21 ± 3
$X_{cp} \pm S$				19 ± 3

Таблица 3. Результаты испытаний при посеве 10 и 100 м.к. вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA из взвеси, приготовленной по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, эквивалентной концентрации $1,7 \times 10^9$ м.к./мл (КОЕ)

Table 3. Results of testing following the seeding of 10 and 100 microbial cells of the *B. abortus* 19 BA suspension prepared based on the industrial reference standard of bacterial suspension turbidity, 10 IU, with the concentration equivalent to 1.7×10^9 microbial cells/mL (CFU)

Номер испытания Test number	Оператор Operator	Среднее количество выросших КОЕ при посеве <i>B. abortus</i> 19 BA Mean number of CFUs grown following the seeding of <i>B. abortus</i> 19 BA	
		~10 м.к. ~10 microbial cells	~100 м.к. ~100 microbial cells
1	1	16	172
	2	13	149
	3	17	180
	4	18	181
2	1	22	230
	2	26	234
	3	25	245
3	1	16	170
	2	14	124
	3	12	142
4	1	19	197
	2	22	149
	3	26	150
5	1	21	174
	2	21	152
	3	32	139
6	1	20	166
	2	14	177
	3	15	134
$X_{cp} \pm S$		19 ± 5	172 ± 34

бруцелл по ОСО мутности 10 МЕ может достигать значения 3×10^9 м.к./мл.

Если допустить, что коэффициент концентрации бруцелл по ОСО мутности эквивалентен значению 3×10^9 м.к./мл, то соответственно потребуются пересчет общей концентрации микробных клеток (ОК) в вакцине по формуле (3):

$$OK = (0,1 + n) \times 10 \times 3,0 \times 10^9, \quad (3)$$

где ОК — общая концентрация микробных клеток в 1 мл (м.к./мл); 0,1 — объем растворенной вакцины, мл; n — объем 0,9% раствора натрия хлорида, взятый для разведения пробы до ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, мл; 10 — постоянная величина (пересчет в 1 мл вакцины); $3,0 \times 10^9$ — коэффициент концентрации микробных клеток для бруцелл по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ.

Таблица 4. Результаты испытаний при посеве 100 м.к. вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA в серии разведений (КОЕ)
Table 4. Test results following the seeding of 100 microbial cells of the *B. abortus* 19 BA vaccine strain in a series of dilutions (CFU)

Номер испытания Test number	Оператор Operator	Среднее количество выросших КОЕ <i>B. abortus</i> 19 BA при посеве ~100 м.к. Mean number of CFUs grown following the seeding of ~100 microbial cells of <i>B. abortus</i> 19 BA				
		1 + 0,5	1 + 1	1 + 1,5	1 + 2	1 + 2,5
1	1	139	121	91	71	55
	2	115	85	61	54	48
	3	129	116	96	53	32
2	1	189	140	115	81	41
$X_{cp} \pm S$		143 ± 32	116 ± 23	91 ± 22	65 ± 13	44 ± 10

Таблица 5. Результаты статистического анализа количества выросших КОЕ вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA при посеве 100 м.к. в серии разведений с помощью критерия Стьюдента
Table 5. Results of the Student's *t*-test statistical analysis of the number of CFUs grown following the seeding of 100 microbial cells of the *B. abortus* 19 BA vaccine strain in a series of dilutions

Разведение Dilution	Статистические показатели при разведении Statistics for dilutions						
	3				3,5		
	$t_{кр}$ $t_{critical}$	$t_{эксп}$ $t_{experimental}$	p	Вывод о статистической значимости / незначимости различий Conclusion on the statistical significance of the difference	$t_{кр}$ $t_{critical}$	$t_{эксп}$ $t_{experimental}$	Вывод о статистической значимости / незначимости различий Conclusion on the statistical significance of the difference
1,5	2, 447	4,37	0,007	значимо significant	5,88	0,002	значимо significant
2		3,84	0,012	значимо significant	5,80	0,002	значимо significant
2,5		1,98	0,104	незначимо insignificant	3,84	0,012	значимо significant
3		не определяли not determined			2,51	0,054	значимо significant
3,5		2,51	0,054	значимо significant	не определяли not determined		

Примечание. $t_{кр}$ — критическое (табличное) значение *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $\alpha = 0,05$; $t_{эксп}$ — значение *t*-критерия Стьюдента, рассчитанное по экспериментальным данным; p — вероятность.

Note. $t_{critical}$ — critical (tabular) value of the Student's *t*-test at the significance level $\alpha = 0.05$; $t_{experimental}$ — Student's *t*-test value calculated for the experimental data; p — probability.

Таблица 6. Результаты испытаний при посеве 10 и 100 м.к. из взвеси вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA, приготовленной по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, эквивалентной концентрации $3,0 \times 10^9$ м.к./мл (КОЕ)
Table 6. Results of testing following the seeding of 10 and 100 microbial cells of the *B. abortus* 19 BA suspension prepared based on the industrial reference standard of bacterial suspension turbidity, 10 IU, with the concentration equivalent to 3.0×10^9 microbial cells/mL (CFU)

Номер испытания Test number	Оператор Operator	Среднее количество выросших КОЕ из взвеси <i>B. abortus</i> 19 BA с концентрацией $3,0 \times 10^9$ м.к./мл по ОСО мутности 10 МЕ Mean number of CFUs grown following the seeding of the <i>B. abortus</i> 19 BA suspension with the concentration of 3.0×10^9 microbial cells/mL according to the industrial reference standard of turbidity, 10 IU	
		~10 м.к. ~10 microbial cells	~100 м.к. ~100 microbial cells
1	1	10	94
	2	9	52
	3	6	50
2	1	10	84
	2	9	80
	3	8	85
3	1	10	92
	2	6	93
	3	8	89
$X_{cp} \pm S$		8 ± 2	80 ± 17

Таблица 7. Результаты испытаний при посеве ОСО вакцины бруцеллезной живой серии 6 (КОЕ)
Table 7. Results of testing following the seeding of the industrial reference standard of live brucellosis vaccine, batch 6 (CFU)

Номер образца Sample number	Среднее количество выросших КОЕ из взвеси вакцины бруцеллезной по ОСО мутности 10 МЕ, эквивалентной концентрации $1,7 \times 10^9$ м.к./мл Mean number of CFUs grown from the brucellosis vaccine suspension with the concentration equivalent to 1.7×10^9 microbial cells/mL according to the industrial reference standard of turbidity, 10 IU		Среднее количество выросших КОЕ из взвеси вакцины бруцеллезной по ОСО мутности 10 МЕ, эквивалентной предположительной концентрации $3,0 \times 10^9$ м.к./мл Mean number of CFUs grown from the brucellosis vaccine suspension with the concentration equivalent to 3.0×10^9 microbial cells/mL according to the industrial reference standard of turbidity, 10 IU	
	~10 м.к. ~10 microbial cells	~100 м.к. ~100 microbial cells	~10 м.к. ~10 microbial cells	~100 м.к. ~100 microbial cells
1	9	94	7	64
2	15	153	9	89
3	5	88	4	64
4	12	115	11	75
5	10	75	3	73
6	10	124	3	74
7	12	98	8	84
8	9	126	6	61
9	26	187	8	91
10	9	76	5	49
11	17	121	10	79
12	12	113	7	71
13	14	131	9	82
14	14	130	7	64
15	14	166	10	83
16	12	112	8	70
17	18	152	6	78
18	9	97	5	66
19	16	103	6	59
20	9	102	4	64
$X_{cp} \pm S$	13 ± 4	118 ± 29	7 ± 2	72 ± 11

При пересчете результатов испытаний 9 серий вакцины бруцеллезной по показателю «Специфическая активность» (общая концентрация и количество живых микробных клеток) на предприятии-производителе и в ИЦЭК МИБП установлено, что общая концентрация микробных клеток в вакцине составляет $(12,6 \pm 1,5) \times 10^{10}$ и $(12,7 \pm 1,0) \times 10^{10}$ м.к./мл. Соответственно и количество живых микробных клеток в вакцине составит $75 \pm 12\%$ на производстве и $65 \pm 11\%$ в ИЦЭК МИБП, что является оптимальным соотношением общей концентрации микробных клеток и живых микробных клеток для данного показателя в живых бактериальных вакцинах (табл. 8).

В связи с этим считаем возможным внесение изменений в требования к показателю качества «Специфическая активность» (концентрация микробных клеток) вакцины бруцеллезной живой в следующей редакции: концентрация микробных клеток должна составлять $(12 \pm 5) \times 10^{10}$ м.к./мл (в соответствии с НД $(7 \pm 3) \times 10^{10}$ м.к./мл).

Также есть основания к изменению требований к показателю качества вакцины «Специфическая активность» (количество живых микробных клеток): количество живых микробных клеток должно составлять не менее 40% от общей концентрации (в соответствии с НД — не менее 60%). Данное требование коррелирует с требованиями к данному показателю для других

живых вакцин против особо опасных инфекционных заболеваний. Например, в вакцине чумной живой должно быть не менее 25% живых микробных клеток от общей концентрации⁷, в живых вакцинах туляреминой⁸ и сибиреязвенной⁹ — не менее 40%.

В связи с увеличением общей концентрации микробных клеток в вакцине бруцеллезной живой соответственно изменится и требование к показателю «Специфическая активность» (количество накожных доз): в ампуле с вакциной должно быть от 7 до 17 накожных доз (в соответствии с НД — от 4 до 10). Установленное экспериментально количество накожных доз на предприятии-производителе и в ИЦЭК МИБП (9 ± 1 и 8 ± 1 соответственно) попадает в диапазон предлагаемых требований от 7 до 17 (табл. 8).

Таким образом, по нашим предварительным данным концентрация бруцелл по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ не соответствует значению $1,7 \times 10^9$ м.к./мл. Возможная причина выявленного несоответствия состоит в морфологических особенностях микроорганизма — бруцеллы представляют собой мелкие коккобациллы или короткие палочки, которые располагаются беспорядочно и образуют скопления¹⁰, что значительно затрудняет их подсчет в камере Горяева. Поэтому рекомендуемое в Государственной фармакопее Российской

⁷ Фармакопейная статья 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.

⁸ Фармакопейная статья 3.3.1.0019.15 Вакцина туляреминая живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁹ Фармакопейная статья 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.

Таблица 8. Результаты испытания вакцины бруцеллезной живой по показателю «Специфическая активность» на производстве (данные паспорта) и в ИЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в период с 2012 по 2020 г.

Table 8. Results of specific activity testing of the live brucellosis vaccine during production (passport information) and by the TCEMIPQ from 2012 to 2020

Период испытаний Time period	Концентрация м.к./мл по ОСО мутности 10 МЕ Concentration, microbial cells/mL according to the industrial reference standard of turbidity, 10 IU		Процент живых м.к. Percent of living microbial cells		Количество доз в ампуле Number of doses per ampoule	
	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	ИЦЭК МИБП ТСЕМПQ	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	ИЦЭК МИБП ТСЕМПQ	Производство (данные паспорта) Production (passport data)	ИЦЭК МИБП ТСЕМПQ
2012	12,7×10 ¹⁰	14,3×10 ¹⁰	78	55	10	8
2013	13,4×10 ¹⁰	13,4×10 ¹⁰	78	78	10	10
2015	13,1×10 ¹⁰	12,7×10 ¹⁰	53	55	7	7
2016	14,1×10 ¹⁰	14,1×10 ¹⁰	65	57	9	8
2016	14,1×10 ¹⁰	12,0×10 ¹⁰	64	77	9	9
2017	9,7×10 ¹⁰	11,6×10 ¹⁰	85	65	8	8
2018	12,3×10 ¹⁰	12,3×10 ¹⁰	81	52	10	6
2019	11,3×10 ¹⁰	11,8×10 ¹⁰	87	63	10	7
2020	12,1×10 ¹⁰	12,3×10 ¹⁰	84	79	10	10
$X_{cp} \pm S$	(12,6 ± 1,5)×10 ¹⁰	(12,7 ± 1,0)×10 ¹⁰	75 ± 12	65 ± 11	9 ± 1	8 ± 1

Федерации XIV изд. определение концентрации бактериальной взвеси в камере Горяева с помощью микроскопа при увеличении ×40 не позволяет достаточно точно подсчитать единичные клетки бруцелл¹¹ [8].

ОСО мутности бактериальных взвесей используется не только для определения общей концентрации микробных клеток в бруцеллезной вакцине, но и при контроле чувствительности питательных сред для культивирования и выделения бруцеллезного микроба и диагностических препаратов, а также при разведении взвеси вирулентного штамма при испытании иммуногенности вакцины. Несоответствие коэффициента концентрации бруцеллезного микроба ОСО мутности в таких испытаниях может привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам. В связи с этим для внесения соответствующих изменений в НД на вакцину бруцеллезную, а также в паспорт и инструкцию по применению на ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (ОСО 42-28-85П) по коэффициенту концентрации бруцелл необходимо провести ряд дополнительных испытаний, в том числе и на других видах бруцелл.

Заключение

При анализе полученных результатов испытания вакцины бруцеллезной по показателю «Специфическая активность» (концентрация микробных клеток, количество живых микробных клеток, количество накожных доз) и вакцинного штамма *B. abortus* 19-BA установлено следующее.

1. Коэффициент концентрации бруцелл в бактериальной взвеси по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ не соответствует значению 1,7×10⁹ м.к./мл и требует уточнения.

2. Согласно предварительным результатам коэффициент концентрации бруцеллезного микроба по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ может достигать значения 3,0×10⁹ м.к./мл.

3. Полученные результаты служат основанием для проведения дополнительных исследований, в том числе с использованием других видов бруцелл, с целью уточнения коэффициента

концентрации бруцеллезного микроба для внесения его в дальнейшем в паспорт и инструкцию по применению на ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ.

4. Полученные в дальнейших исследованиях значения коэффициента концентрации бруцелл по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ послужат основанием для внесения изменений в требования нормативной документации на вакцину бруцеллезную живую по показателю качества «Специфическая активность» (концентрация микробных клеток, количество живых микробных клеток, количество накожных доз).

Вклад авторов. И. В. Касина — идея, концепция и дизайн исследования, экспериментальная работа по определению концентрации в бактериальной взвеси вакцинного штамма *B. abortus* 19-BA по ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ в серии разведений, обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка результатов, написание текста и критический пересмотр его содержания; С. А. Алексеева — экспериментальная работа по определению концентрации бруцелл в бактериальной взвеси ОСО вакцины бруцеллезной живой, эквивалентной ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста; Т. И. Немировская — корректировка текста статьи и окончательное утверждение версии статьи для публикации.

Authors' contributions. Irina V. Kasina—elaboration of the study idea, concept, and design; experimental work on determination of brucella concentration in the bacterial suspension of the *Brucella abortus* strain 19 BA in a series of dilutions by comparison with the industrial reference standard of bacterial suspension turbidity, 10 IU; summarising of experimental data; analysis, interpretation, and statistical processing of the results; writing and revising of the text; Svetlana A. Alekseeva—experimental work on determination of brucella concentration that is equivalent to the industrial reference standard of bacterial suspension turbidity, 10 IU, in the bacterial suspension of the industrial reference

¹⁰ Поздеев ОК. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2004.

¹¹ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

standard of live brucellosis vaccine; analysis and interpretation of the study results; **Tatyana I. Nemirovskaya**—revising of the text and approval of the final version of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9). Выражаем благодарность главному технологу ИЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России кандидату биологических наук Ольге Васильевне Фадейкиной за оказанную помощь в статистической обработке результатов.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9). The authors express their gratitude to Olga Fadeykina, Candidate of Biological Sciences, chief technologist of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation for her assistance in the statistical processing of the results.

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

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

Литература/References

1. Желудков ММ, Цирельсон ЛЕ. Резервуары бруцеллезной инфекции в природе. *Зоологический журнал*. 2010;89(1):53–60. [Zheludkov MM, Tsirelson LE. Reservoirs of Brucella infection in nature. *Zoologicheskii zhurnal = Zoological Journal*. 2010;89(1):53–60 (In Russ.)]
2. Лямкин ГИ, Пономаренко ДГ, Худолеев АА, Вилинская СВ, Зайцев АА, Куличенко АН. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации и государствах — участниках Содружества Независимых Государств. *Инфекционные болезни. Новости. Мнения. Обучение*. 2016;(1):68–74. [Lyamkin GI, Ponomarenko DG, Khudoleev AA, Vilinskaya SV, Zaytsev AA, Kulichenko AN. The epidemiological situation of brucellosis the Russian Federation and the member states of the Commonwealth of Independent States. *Infektsionnyye bolezni. Novosti. Mneniya. Obucheniye = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2016;(1):68–74 (In Russ.)]
3. Охупкина ВЮ, Пяткова НВ, Павлов ДЛ, Суслопаров АА. Эпидемиологическая опасность бруцеллеза в современных условиях. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(3):15–22. [Okhapkina VYu, Pyatkova NV, Pavlov DL, Susloparov AA. Epidemic risk of brucellosis in modern conditions. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(3):15–22 (In Russ.)]
4. Попова ТГ, Новицкий АА, Колычев НМ. Эпизоотологические и экологические аспекты специфической профилактики бруцеллеза. *Ветеринария*. 2012;(3):24–6. [Popova TG, Novitskiy AA, Kolychev NM. Epizootological and environmental aspects of specific prophylaxis brucellosis. *Veterinariya = Veterinary Medicine*. 2012;(3):24–6 (In Russ.)]
5. Цирельсон ЛЕ, Желудков ММ, Кулаков ЮК. Обзор проблем вакцинопрофилактики бруцеллеза. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013;3(70):77–81. [Tsirel'son LE, Zheludkov MM, Kulakov YUK. Overview of problems of vaccinal prevention of brucellosis. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2013;3(70):77–81 (In Russ.)]
6. Мовсесянц АА, Миронов АН, Меркулов ВА, Борисевич ИВ. Цели и задачи Испытательного центра экспертизы качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2012;(1):7–9. [Movsesyants AA, Mironov AN, Merkulov VA, Borisevich IV. Aims and objectives Testing Center for Quality Expertise of Medical Immunobiological Preparations. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2012;(1):7–9 (In Russ.)]
7. Мовсесянц АА, Бондарев ВП, Олещук ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(2):38–41. [Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Shimchuk LF. Quality standards for immunobiological medicinal products—new texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(2):38–41 (In Russ.)]
8. Фадейкина ОВ, Касина ИВ, Алексеева СА, Ковтун ВП, Бурдина ЕН, Ермолаева ТН и др. Применение отраслевого стандартного образца мутности бактериальных взвесей для определения общей концентрации микробных клеток в суспензиях сибиреязвенного, чумного и бруцеллезного микробов. *Успехи современного естествознания*. 2015;1(8):1287–90. [Fadeikina OV, Kasina IV, Alekseeva SA, Kovtun VP, Burdina EN, Ermolaeva TN, et al. Application of an industry standard sample of turbidity of bacterial suspensions to determine the total concentration of microbial cells in suspensions of anthrax, plague and brucellosis microbes. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya = The Successes of Modern Science*. 2015;1(8):1287–90 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Касина Ирина Владимировна, канд. биол. наук. Irina V. Kasina, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2002-0151>

Алексеева Светлана Александровна, канд. биол. наук. Svetlana A. Alekseeva, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5804-5709>

Немировская Татьяна Ивановна, канд. мед. наук. Tatyana I. Nemirovskaya, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0848-7306>

Поступила 08.07.2019

После доработки 25.05.2020

Принята к публикации 27.05.2020

Received 8 July 2019

Revised 25 May 2020

Accepted 27 May 2020



Мая Сергеевна Воробьева (к 85-летию со дня рождения)

Maya Sergeevna Vorobieva (on the 85th Anniversary)

13 июня 2020 г. исполнилось 85 лет со дня рождения доктора медицинских наук, профессора Май Сергеевны Воробьевой.

В 1958 г. М. С. Воробьева окончила 2-й Московский государственный медицинский институт им. Н. И. Пирогова (в настоящее время — ФGAOY BO PИMИY им. Н. И. Пирогова) по специальности «Лечебное дело». С 1959 г. обучалась в аспирантуре в Научно-исследовательском институте экспериментальной биологии и медицины (в настоящее время — ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е. Н. Мешалкина» Минздрава России). По распределению М. С. Воробьева была направлена в лабораторию клещевого энцефалита в Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д. И. Ивановского к известному советскому ученому-вирусологу, профессору, доктору медицинских наук Е. Н. Левкович. По окончании аспирантуры М. С. Воробьева успешно защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата наук по теме «Взаимоотношение вируса клещевого энцефалита с организмом пойкилотермных животных».

Свою научную деятельность М. С. Воробьева продолжила в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова. С 1968 г. работала старшим научным сотрудником в ГИСК им. Л. А. Тарасевича, где в дальнейшем (1969 г.) возглавила лабораторию арбовирусных инфекций и риккетсиозов (переименована в лабораторию арбовирусных инфекций, риккетсиозов и ВИЧ-инфекции).

В составе творческих коллективов М. С. Воробьева занималась разработкой вакцины для профилактики клещевого энцефалита культуральной инактивированной на основе штамма «Софьин», изучением штаммов вируса клещевого энцефалита, полученных из природных очагов, что в дальнейшем позволило выявить новый штамм вируса клещевого энцефалита «205».

В 1986 г. М. С. Воробьева успешно защитила диссертацию («Принципы стандартизации и совершенствование методов контроля вакцин против клещевого энцефалита») на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности «Вирусология». Многолетняя научно-исследовательская работа М. С. Воробьевой послужила основой для разработки методов стандартизации и контроля качества инактивирован-

ных вакцин против клещевого энцефалита с использованием отраслевого стандартного образца для изучения специфической активности (иммуногенности) вакцин.

При непосредственном участии М. С. Воробьевой впервые в стране были созданы стандартные панели сывороток крови человека, содержащие антитела к ВИЧ-1, 2 и антиген р24 ВИЧ-1. Использование аттестованных в ГИСК им. Л. А. Тарасевича стандартных панелей стало основой создания мощнейшей системы контроля качества иммуноферментных тест-систем для диагностики ВИЧ-инфекции. Под руководством М. С. Воробьевой была усовершенствована система контроля и стандартизации ряда вакцинных препаратов (против клещевого энцефалита, герпеса простого, желтой лихорадки).

С 2011 г., после присоединения ГИСК им. Л. А. Тарасевича к ФБГУ «НЦЭСМП» Минздрава России, М. С. Воробьева работала главным экспертом в Управлении экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП. Принимала активное участие в научно-исследовательских работах, посвященных изучению протективных свойств современных отечественных и европейских вакцин против клещевого энцефалита. Под руководством Май Сергеевны защищены 6 кандидатских и 2 докторские диссертации.

За участие в разработке новой вакцины против клещевого энцефалита М. С. Воробьева была удостоена Премии Совета Министров СССР (1984 г.), за участие в разработке новой вакцины против Венесуэльского энцефаломиелимита лошадей — Премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники (1998 г.).

М. С. Воробьева — автор более 300 научных работ, 2 монографий, 8 патентов на изобретение Российской Федерации; член-корреспондент РАЕН, академик Международной академии информатизации, член редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». М. С. Воробьева награждена медалью «Отличнику здравоохранения», ей присвоено звание «Ветеран труда».

Сердечно поздравляем Майю Сергеевну с юбилеем! Желаем крепкого здоровья, долгих лет жизни и прекрасного настроения!

Научно-практическая конференция «Экспертиза и регистрация лекарственных средств в ЕАЭС» («RegLek — ЕАЭС 2020»)

Applied Research Conference “Expert Evaluation and Approval of Medicinal Products in the Eurasian Economic Union” (“RegLek EAEU 2020”)



RegLek — ЕАЭС

С 6 по 14 июля 2020 года в онлайн-формате состоится научно-практическая конференция «Экспертиза и регистрация лекарственных средств в ЕАЭС» («RegLek — ЕАЭС 2020»)¹, первоначально запланированная 20–22 апреля 2020 года. Изменение сроков проведения конференции и онлайн-формат обусловлены сложившейся эпидемической ситуацией в России.

Конференция «RegLek — ЕАЭС 2020» является уникальной площадкой, на которой можно не только напрямую услышать комментарии ведущих экспертов регуляторных органов стран — участниц Евразийского экономического союза по формируемым единым правилам регистрации лекарственных препаратов, но также задать вопросы и получить разъяснения в ходе работы круглых столов.

В конференции примут участие ведущие эксперты и представители регуляторных органов стран ЕАЭС (Российская Федерация, Республика Беларусь, Республика Казахстан и др.), сотрудники зарубежных и российских фармацевтических компаний — производителей и поставщиков лекарственных средств.

В работе конференции запланировано проведение пленарного заседания и 13 секционных заседаний, которые будут проводиться в три сессии:

- Сессия 1: 6–7 июля 2020 г.;
- Сессия 2: 9–10 июля 2020 г.;
- Сессия 3: 13–14 июля 2020 г.

В программе конференции после каждого секционного заседания предусмотрено дополнительное время для проведения дискуссии.

Основные темы конференции:

1. Особенности организации проведения регуляторных процедур по правилам ЕАЭС в странах Союза. Организация информационного обмена (06.07.2020).

2. Очистка промышленных линий по производству ЛС и пределы воздействия на здоровье (07.07.2020).

3. Экспертиза материалов регистрационного досье в части оценки качества по процедурам ЕАЭС (07.07.2020).

4. Особая продукция — особая регистрация (07.07.2020).

5. Инспектирование в ЕАЭС: кого, когда, зачем и как? (07.07.2020).

6. Место инновационных (гибридных) и комбинированных лекарственных препаратов в системе регистрации ЕАЭС (09.07.2020).

7. Экспертные требования к оценке соотношения ожидаемой пользы к возможным рискам применения препаратов: критический взгляд на анализируемые досье (09.07.2020).

8. Надлежащая регуляторная практика ЕАЭС (10.07.2020).

9. Формирование и использование информации о лекарственных препаратах: что нужно знать фармпроизводителю (10.07.2020).

10. Различные подходы к маркировке лекарственных препаратов на этапе технологического процесса (13.07.2020).

11. В центре проблемы: модуль № 3 регистрационного досье и приведение в соответствие с правилами Союза (13.07.2020).

12. Актуальное состояние применения правил и требований ЕАЭС при подаче электронного общего технического документа (14.07.2020).

13. Фармакопейная сессия (14.07.2020).

В работе пленарного заседания (06.07.2020) примут участие представители ЕЭК, Минздрава России, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Росздравнадзора, ФБУ «ГИЛС и НП».

На секционном заседании **«Особенности организации проведения регуляторных процедур по правилам ЕАЭС в странах Союза. Организация информационного обмена»** будут рассмотрены вопросы практики организации работ по экспертизе по правилам ЕАЭС в Республике Казахстан, Республике Армения, Республике Беларусь, а также в Российской Федерации. Докладчиками выступят представители Научного центра экспертизы лекарств и медицинских технологий имени академика Эмиля Габриеляна, Центра экспертиз и испытаний в здравоохранении Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Научного центра экспертизы средств медицинского применения Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В работе секционного заседания **«Очистка промышленных линий по производству лекарственных средств и пределы воздействия на здоровье»** запланированы доклады о нормативных требованиях ЕАЭС к очистке, об изучении ДНК-креативных (мутатогенных) примесей, об основных проблемах валидации очистки, а также о результатах оценки организации очистки промышленных линий в рамках инспекций GMP.

На секционном заседании **«Особая продукция — особая регистрация»** будут обсуждаться регуляторные требования по системам ускоренного доступа лекарственных препаратов на рынок, проблемы регулирования непрерывного фармацевтического производства, вопросы экспертизы и регистрации

¹ Программа конференции, заявка на участие в конференции, а также дополнительная информация размещены на сайте www.fru.ru

орфанных лекарственных препаратов, а также лекарственных препаратов для педиатрии. Докладчиками выступают представители Управления фармацевтической инспекции и организации лекарственного обеспечения Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Департамента технического регулирования и аккредитации ЕЭК.

Вопросы надлежащей производственной практики, надлежащей лабораторной практики, надлежащей практики фармаконадзора, надлежащей клинической практики будут рассмотрены на секционном заседании **«Инспектирование в ЕАЭС: кого, когда, зачем и как?»**. Докладчиками выступают представители Института токсикологии ФМБА России, Центра экспертиз и испытаний в здравоохранении Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Работу второй сессии откроет доклад «Единый рынок лекарственных средств Евразийского экономического союза: реалии, перспективы и проблемы» (докладчики — представители Департамента технического регулирования и аккредитации Евразийской экономической комиссии). В ходе работы секционных заседаний будут рассмотрены критерии гибридности, программы разработки для гибридных лекарственных препаратов, программы клинической разработки и возможности оптимизации для комбинированных лекарственных препаратов, особенности формирования регистрационного досье на гибридные лекарственные препараты. Представители ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России на секционном заседании **«Экспертные требования к оценке соотношения ожидаемой пользы к возможным рискам применения препаратов: критический взгляд на анализируемые досье»** выступят с докладами по вопросам проведения клинических исследований в ЕАЭС, роли клинических исследований терапевтической эквивалентности в клинической программе изучения лекарственных средств. Будут обсуждаться вопросы, касающиеся объема клинических исследований воспроизведенных препаратов в рамках правил ЕАЭС, обоснованности клинической разработки пролонгированных (модифицированных) пероральных лекарственных форм препаратов, особенности клинической оценки препаратов для применения у детей.

На секционном заседании **«Надлежащая регуляторная практика ЕАЭС»** будут представлены доклады по темам:

- «Дорожная карта» по принятию изменений актов ЕАЭС в сфере обращения лекарственных средств в 2020 г.;
- Информационные ресурсы ЕАЭС: логия для начинающих и лайфхаки для продвинутых;

- Справочники и классификаторы ЕАЭС в сфере обращения лекарственных средств: разработка, применение и актуализация.

В работе секционного заседания **«Формирование и использование информации о лекарственных препаратах: что нужно знать фармпроизводителю»** запланировано обсуждение вопросов формирования общей характеристики лекарственных препаратов (ОХЛП) и инструкции по медицинскому применению (листка-вкладыш) (ИМП (ЛВ)) в рамках процедур ЕАЭС, пользовательского тестирования (валидации) инструкции по медицинскому применению, а также правил сбора и отчетности информации об эффектах лекарственных препаратов в пострегистрационных исследованиях, требования к фармацевтическим производителям по составлению листка-вкладыша как нового источника информации о лекарственном препарате для населения.

В работе третьей сессии конференции запланировано проведение четырех секционных заседаний. Различия в национальных спецификациях и нормативных документах как основная проблема гармонизации досье, судьба нормативного документа по контролю качества, включение результатов исследований стабильности в состав гармонизированного модуля 3, проблемы с составлением модуля 3 будут рассмотрены в докладах представителей Центра экспертиз и испытаний в здравоохранении Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Витебского государственного медицинского университета.

На секционном заседании **«Актуальное состояние применения правил и требований ЕАЭС при подаче электронного общего технического документа»** планируется рассмотрение и обсуждение вопросов электронной подачи досье в Российской Федерации по требованиям ЕАЭС, применения программного обеспечения для формирования электронного общего технического документа согласно правилам и требованиям ЕАЭС. Этапы создания фармакопеи ЕАЭС, презентация ее первого тома, структура, особенности формирования и правовые основы деятельности фармакопейного комитета ЕАЭС будут представлены в ходе работы секционного заседания **«Фармакопейная сессия»**.

Тематика запланированных на конференции «РегЛек — ЕАЭС 2020» докладов несомненно является не только актуальной, но также имеет и огромную практическую значимость. Профессиональный диалог всех заинтересованных участников конференции предоставит возможность получить ответы на все возникающие вопросы.



РегЛек — ЕАЭС 2019. Фотография с сайта <http://www.fru.ru>



РегЛек – ЕАЭС

6–14 июля 2020 г.

Онлайн-формат

Научно-практическая конференция «ЭКСПЕРТИЗА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ЕВРАЗИЙСКОМ ЭКОНОМИЧЕСКОМ СОЮЗЕ» «РЕГЛЕК — ЕАЭС 2020»

В конференции примут участие ведущие эксперты и представители регуляторных органов стран ЕАЭС (Российская Федерация, Республика Беларусь, Республика Казахстан и др.), сотрудники зарубежных и российских фармацевтических компаний производителей и поставщиков лекарственных средств.

Основные темы конференции:

- Особенности организации проведения регуляторных процедур по правилам ЕАЭС в странах союза. Организация информационного обмена;
- Очистка промышленных линий по производству ЛС и пределы воздействия на здоровье;
- Экспертиза материалов регистрационного досье в части оценки качества по процедурам ЕАЭС;
- Особая продукция – особая регистрация;
- Инспектирование в ЕАЭС: кого, когда, зачем и как;
- Место инновационных (гибридных) ЛП в системе регистрации ЕАЭС;
- Экспертные требования к оценке соотношения ожидаемой пользы к возможным рискам применения препаратов: критический взгляд на анализируемые досье;
- Надлежащая регуляторная практика ЕАЭС;
- Формирование и использование информации о лекарственных препаратах: что нужно знать фармпроизводителю;
- Актуальные вопросы экспертизы и регистрации лекарственных средств;
- Выпуск в гражданский оборот ЛП: система заработала, есть ли проблемы;
- Актуальное состояние применения правил и требований ЕАЭС при подаче электронного общего технического документа;
- Различные подходы к маркировке ЛП на этапе технологического процесса;
- Другие актуальные вопросы в сфере экспертизы лекарственных средств.

Программа конференции и заявка на участие на сайте www.fru.ru



Подписку на журнал
«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»
можно оформить в любом почтовом отделении России.

- Подписной индекс в каталоге Агентства «Роспечать»
«Издания органов научно-технической информации» — 57941
- В региональных агентствах подписки
Урал-Пресс (www.ural-press.ru) — 57941
- По объединенному каталогу
«Пресса России» (www.pressa-rf.ru) — T57941



ISSN 2221-996X



9 772221 996004