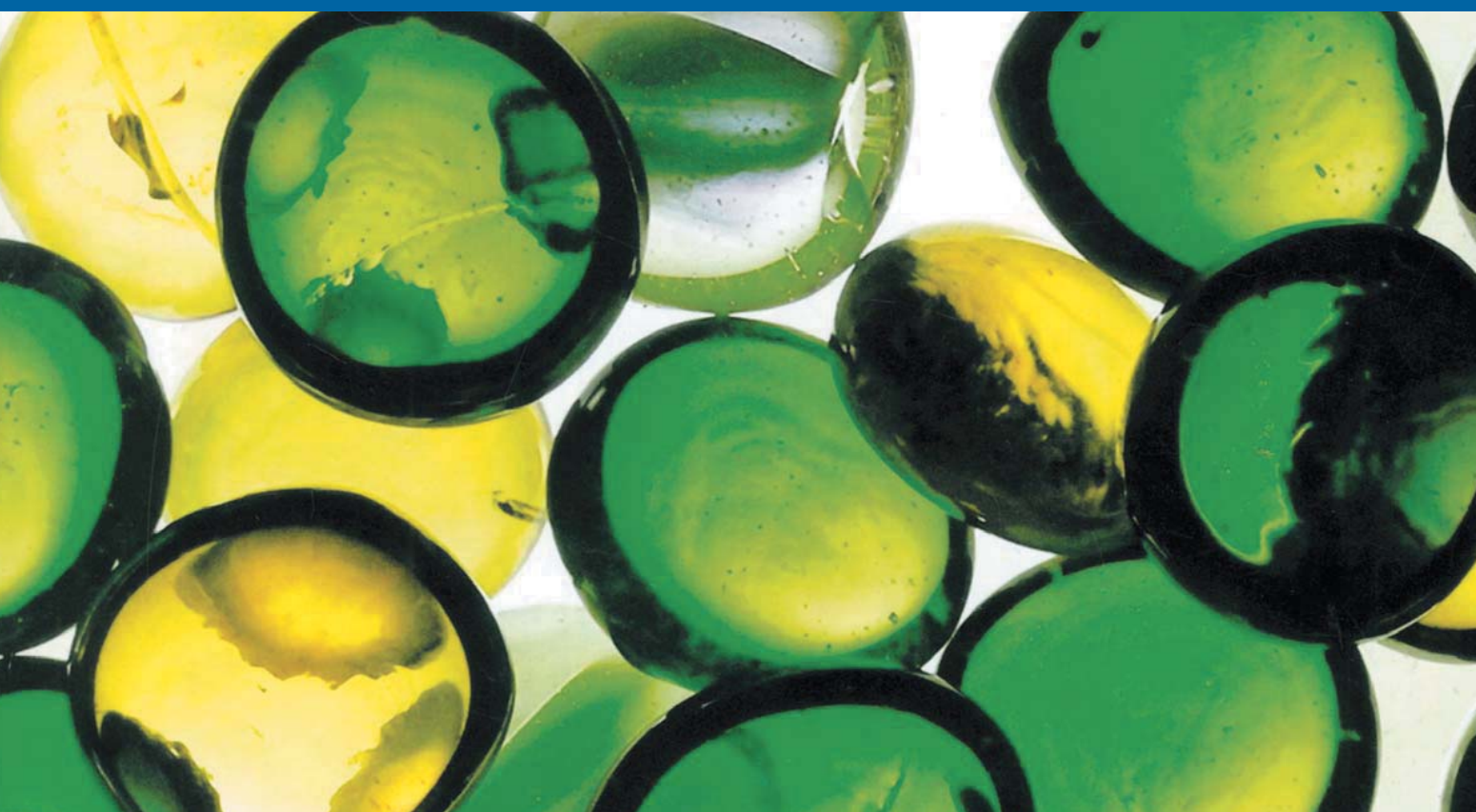


БИО ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

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

Том 20, № **3**
Июль – сентябрь 2020



Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment

В НОМЕРЕ

Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противоэпидемических мероприятий против новой коронавирусной инфекции COVID-19

Сравнительный анализ красителей, используемых при оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграса биологическим методом *in vitro*

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

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.

Пятилетний импакт-фактор РИНЦ — 0,520.

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, № 3
Июль — сентябрь 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. 3
July — September 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, № 3
Июль — сентябрь 2020

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противозидемических мероприятий против новой коронавирусной инфекции COVID-19**
Д. А. Потеряев, Р. А. Хамитов, Г. А. Ефимов, А. М. Шустер 146
- Сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий**
М. А. Водякова, А. Р. Сайфутдинова, Е. В. Мельникова, Ю. В. Олефир 159
- Эффективность специфической профилактики клещевого энцефалита**
М. С. Щербинина, О. А. Бархалева, О. С. Дорохова, А. А. Мовсесянц 174

Оригинальные статьи

- Стабильность отраслевого стандартного образца вакцины туберкулезной (БЦЖ)**
Н. В. Александрова, А. А. Савина, А. В. Наконечная, Д. Т. Леви 187
- Сравнительный анализ красителей, используемых при оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом *in vitro***
О. В. Головинская, М. Л. Байкова, Н. А. Алпатова, Д. А. Зубков, В. В. Фоменко, Л. А. Гайдера 193

Дискуссионные статьи

- Изучение стабильности плазмы человека для фракционирования по показателю активности фактора VIII при моделировании отклонений в температурном режиме хранения и транспортировки**
А. А. Городков, А. Л. Попцов, А. Л. Хохряков 202

Хроника

- Светлана Михайловна Суханова (к 60-летию со дня рождения)** 208
- Вадим Анатольевич Меркулов (к 50-летию со дня рождения)** 209

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: 11.09.2020

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

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

CONTENTS

Reviews

Prospects for Using the ELISPOT Technological Platform as Part of Anti-Epidemic Measures Against the New Coronavirus Infection COVID-19

D. A. Poteryaev, R. A. Khamitov, G. A. Efimov, A. M. Shuster. 146

Comparison of the World Pharmacopoeias' Requirements for the Quality of Cell Lines

M. A. Vodyakova, A. R. Sayfutdinova, E. V. Melnikova, Yu. V. Olefir 159

Effectiveness of Specific Prevention of Tick-Borne Encephalitis

M. S. Shcherbinina, O. A. Barkhaleva, O. S. Dorokhova, A. A. Movsesyants. 174

Original articles

Stability of the Industrial Reference Standard of Tuberculosis Vaccine (BCG)

N. V. Aleksandrova, A. A. Savina, A. V. Nakonechnaya, D. T. Levi 187

Comparative Analysis of Dyes Used in the Assessment of Filgrastim Products Specific Activity by Biological *in vitro* Methods

O. V. Golovinskaya, M. L. Baykova, N. A. Alpatova, D. A. Zubkov, V. V. Fomenko, L. A. Gayderova 193

Discussion articles

Study of the Stability of Factor VIII Activity in Human Plasma for Fractionation When Modeling Deviations in the Storage and Transportation Temperature Conditions

A. A. Gorodkov, A. L. Poptsov, A. L. Khokhryakov. 202

Chronicle

Svetlana Mikhaylovna Sukhanova (on the 60th Anniversary) 208

Vadim Anatol'evich Merkulov (on the 50th Anniversary) 209

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 Partiyiny lane, Moscow 115093

Passed for printing: September 11, 2020

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

Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противозидемических мероприятий против новой коронавирусной инфекции COVID-19

Д. А. Потеряев^{1,*}, Р. А. Хамитов¹, Г. А. Ефимов², А. М. Шустер¹

¹Общество с ограниченной ответственностью
«Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,
ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район,
Владимирская область, 601125, Российская Федерация

²Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Новый Зыковский проезд, д. 4, Москва, 125167, Российская Федерация

Определение наличия Т-клеточного иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2 актуально как для диагностики заболевания у пациентов с наличием симптомов, так и для определения общего количества людей, перенесших данное заболевание, в том числе бессимптомно. Кроме того, данные тесты эффективны для оценки иммунного ответа после проведения вакцинации, а также оценки напряженности специфического иммунитета в группах риска и ранее переболевших. При этом среди методов оценки Т-клеточного иммунного ответа наиболее перспективным является тест ELISPOT на выброс интерферона гамма (IGRA) под действием специфических вирусных антигенов. В обзоре рассмотрены перспективы использования технологической платформы ELISPOT в клинико-лабораторной практике при работе с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 с учетом особенностей иммунного ответа при данном заболевании. В качестве источников литературы использовались статьи, опубликованные в реферируемых журналах, препринты статей, размещенные на ресурсах arXiv, кроме того, использовались личные коммуникации авторов с ведущими иммунологами. Показано, что внедрение В- и Т-клеточного ELISPOT-тестов позволяет осуществлять мониторинг иммунологического статуса пациентов и выбор тактики лечения, выявлять наиболее уязвимые группы населения, осуществлять комплексную оценку вакцинных препаратов на этапах разработки, клинических исследований и внедрения в практику. Обсуждаются вопросы сохранения Т-клеточного иммунитета в крови переболевших коронавирусными инфекциями HCoV, SARS, MERS, COVID-19 и преимущества Т-клеточного ELISPOT-теста перед серологическими тестами для эпидемиологической оценки распространенности новой коронавирусной инфекции и в клинических исследованиях вакцин против COVID-19. Биотехнологические компании имеют готовую технологическую платформу, легко адаптируемую под конкретный вид анализа и патогена, для разработки и промышленного производства наборов ELISPOT. Подтверждена необходимость разработки вакцин, стимулирующих как клеточный, так и гуморальный иммунные ответы, поднят вопрос о защитном потенциале перекрестного иммунитета, приобретенного до пандемии COVID-19.

Ключевые слова: ELISPOT; SARS-CoV-2; COVID-19; Т-лимфоциты; В-клетки; антитела; вакцина; иммунитет

Для цитирования: Потеряев ДА, Хамитов РА, Ефимов ГА, Шустер АМ. Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противозидемических мероприятий против новой коронавирусной инфекции COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(3):146–158. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158>

Контактное лицо: Потеряев Дмитрий Александрович; poteryaev@ibcgenerium.ru

Prospects for Using the ELISPOT Technological Platform as Part of Anti-Epidemic Measures Against the New Coronavirus Infection COVID-19

D. A. Poteryaev^{1,*}, R. A. Khamitov¹, G. A. Efimov², A. M. Shuster¹

¹International Biotechnology Center “GENERIUM”,
14 Vladimirskaia St., Volginsky town, Petushinskiy District,
Vladimir Oblast 601125, Russian Federation

²National Research Center for Hematology,
4 Novy Zykovsky proezd, Moscow 125167, Russian Federation

Determination of T-cell immune response to SARS-CoV-2 is important both for diagnosis of the disease in symptomatic patients, and for determination of the total number of people who have had the disease, including its

asymptomatic form. In addition, these assays are efficient for assessing the immune response after vaccination, as well as immunity levels in risk groups and in convalescent patients. The most promising method of T-cell immune response assessment is an ELISPOT-based assay measuring the release of interferon-gamma (IGRA) after stimulation with coronavirus-specific antigens. The present review analyses the prospects for using the ELISPOT technological platform in the clinical laboratory setting when dealing with the new coronavirus infection COVID-19, given specific aspects of the immune response. The review summarises data from articles published in peer-reviewed journals, preprints of articles available at arXiv resources, and information that some leading immunologists shared with the authors during private discussions. It has been shown that the introduction of B- and T-cell ELISPOT assays will make it possible to monitor the immunological status of patients, select a treatment strategy, identify the most vulnerable populations, carry out comprehensive assessment of vaccines during the development, clinical trials and implementation stages. The paper discusses the issues of maintaining T-cell immunity in the blood of people who have had HCoV, SARS, MERS, and COVID-19 coronavirus infections. It also discusses the advantages of the T-cell ELISPOT assay over serological tests as regards epidemiological assessment of the prevalence of the new coronavirus infection, and clinical trials of COVID-19 vaccines. Biotechnology companies have a ready-made technological platform for the development and industrial-scale production of ELISPOT kits, and this platform is easily adaptable to specific types of assays and pathogens. The paper supports the need to develop vaccines that would stimulate both cellular and humoral immune responses, and raises the question of the protective potential of cross-immunity acquired before the COVID-19 pandemic.

Key words: ELISPOT; SARS-CoV-2; COVID-19; T-cells; B-cells; antibodies; vaccine; immunity

For citation: Poteryaev DA, Khamitov RA, Efimov GA, Shuster AM. Prospects for using the ELISPOT technological platform as part of anti-epidemic measures against the new coronavirus infection COVID-19. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(3):146–158. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158>

Corresponding author: Dmitry A. Poteryaev; poteryaev@ibcgenerium.ru

Методы оценки Т-клеточного иммунного ответа к COVID-19 широко используются как для диагностики заболевания у пациентов с наличием симптомов, так и для определения общего количества людей, перенесших данное заболевание, в том числе бессимптомно. Кроме того, данные тесты эффективны для оценки иммунного ответа после проведения вакцинации, а также оценки напряженности специфического иммунитета в группах риска и ранее переболевших. При этом среди методов оценки Т-клеточного иммунного ответа наиболее перспективным является IGRA-ELISPOT (Interferon-Gamma Release Assay — Enzyme Linked Spot Analysis, тест на секрецию гамма-интерферона — иммуноферментный анализ пятен), основанный на выбросе интерферона гамма под действием специфических антигенов коронавируса [1].

Имеющиеся данные по SARS-CoV 2002–2003 гг. подтверждают возможность использования ELISPOT для выявления пациентов, перенесших данное заболевание несколько лет назад. Если антитела в сыворотке крови пациентов сохранялись до 16 месяцев, то цитотоксические Т-лимфоциты, специфически реагирующие на N-белок коронавируса, все еще обнаруживались в периферических мононуклеарах переболевших пациентов с SARS или MERS более чем через 10 лет после заражения [2].

Вопрос, наблюдается ли схожая картина при COVID-19, требует дополнительного изучения.

Исследование врожденных и приобретенных иммунных реакций и развитие клеток иммунной защиты у пациентов, которые выздоровели от COVID-19, может стать отправной точкой для разработки профилактических вакцин и иммунотерапии против коронавирусов. Кроме того, есть основание полагать, что необходимо разрабатывать вакцины, которые стимулируют не только гуморальный, но и преимущественно клеточный иммунный ответ.

Цель работы — рассмотреть перспективы использования технологической платформы ELISPOT в клинико-лабораторной практике при работе с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 с учетом особенностей иммунного ответа при данном заболевании. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: а) провести обзор данных литературы о характере и длительности иммунного ответа на SARS-CoV-2; б) проанализировать наиболее подходящие методики, позволяющие не

только характеризовать иммунный ответ, но и прогнозировать иммунную защищенность к повторным инфекциям или после вакцинации; в) оценить возможности введения наиболее ценных методик в широкую клинико-диагностическую практику.

Обоснование разработки и применения Т-клеточного и В-клеточного ELISPOT при исследованиях вакцин против COVID-19

Высокопроизводительные тесты *in vitro*, позволяющие быстро оценивать иммунологический статус больших когорт людей, являются незаменимыми инструментами для проведения популяционных клинических исследований, включая исследование вакцин.

ELISPOT — чувствительный и надежный инструмент для измерения функционального отклика иммунитета путем оценки наличия антиген-специфических цитокин-секретирующих лимфоцитов, присутствующих в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК, РВМС). В течение последних 15 лет метод ELISPOT был доминирующей платформой и стандартом для анализа клеточно-опосредованного иммунитета (КОИ). Анализы ELISPOT широко используются для определения КОИ после первичной или вторичной вакцинации [3].

Наглядным примером является вакцинация против оспы. Несмотря на то что всеобщая вакцинация с помощью вируса осповакцины была прекращена в мире в 1980-х гг., в начале XXI века в США было принято решение возобновить вакцинацию для отдельных групп населения, профессионально связанных с риском новой встречи с этой инфекцией. Это решение стимулировало разработку высокопроизводительных тестов, предназначенных для оперативной и незатратной оценки иммунного статуса больших популяционных когорт после вакцинации.

Известно, что успешная вакцинация против оспы, как и многих других особо опасных вирусов, к которым может быть отнесен и SARS-CoV-2, требует как гуморального, так и клеточного иммунного ответов. Для оценки гуморального ответа часто используют серологические методы, и прежде всего иммуноферментный анализ (ИФА). Однако золотым стандартом является количественный тест на циркулирующие нейтрализующие антитела, специфичные к вирусу. Несмотря на то

что еще нет единого стандарта на КОИ, при вакцинации против оспы для широкомасштабного определения КОИ применялся именно ELISPOT [4].

Тесты ELISPOT могут быть использованы для оценки иммунной памяти (иммунного отклика), для определения количества специфичных для вирусных антигенов лимфоцитов, секретирующих цитокины, и для определения Т-хелперного профиля иммунного ответа вакцинированного.

Так, исследователи клиники Майо (США) оптимизировали использование анализов ELISPOT как на интерферон гамма (IFN γ), так и на IL-10 для точной оценки Th1- и Th2-подобного цитокинового профиля людей, ранее вакцинированных вирусом осповакцины, на основе частоты цитокин-секретирующих лимфоцитов после стимуляции *in vitro* вирусом осповакцины. ELISPOT для измерения секреции IFN γ CD8 $^{+}$ Т-клетками, специфичными к вирусу, не требует какого-либо культивирования, предварительной сортировки или выделения Т-клеток. Данный анализ позволяет более точно измерять специфичный для вакцины ответ путем удаления лимфоцитов, которые не являются специфичными для осповакцины, но все же обладают потенциалом секретировать IFN γ в ответ на стимуляцию вирусом осповакцины (например, NK-клетки) [4].

Таким образом, анализы ELISPOT являются быстрым и надежным методом *in vitro* для мониторинга иммунного ответа после вакцинации против оспы.

В-клеточный ELISPOT позволяет исследовать присутствие секретирующих антитела клеток (ASC) в образцах крови или тканей. Традиционный метод контроля В-клеточного ответа, генерируемого после иммунизации или инфекции, заключается в количественном определении титров специфических антител в сыворотке крови с помощью ИФА. Метод ИФА является простым методом измерения титров антител в сыворотке крови, однако ИФА не дает информации о количестве и местонахождении ASC. В-клеточный ELISPOT специально разработан с этой целью и оказался особенно полезным для идентификации и определения количества отдельных ASC в суспензиях клеток. В-клетки памяти, которые имеют большую продолжительность жизни, играют центральную роль в гуморальном иммунном ответе. В естественных условиях В-клетки памяти не размножаются и не продуцируют антитела до тех пор, пока они не активируются повторным воздействием определенного антигена. Основным преимуществом В-клеточного ELISPOT является его способность активировать антиген-специфические В-клетки памяти *ex vivo*, после чего они могут быть обнаружены и подсчитаны визуально. ELISPOT В-клеток является предпочтительным анализом для определения напряженности иммунитета и длительности защиты от определенной инфекции (например, при вакцинации) [5]. Анализ ELISPOT В-клеток полезен в различных областях биомедицинских исследований, включая разработку вакцин, исследования инфекций, в фармакотерапии, а также при изучении аутоиммунных заболеваний и аллергии.

Большинство вакцин, разрешенных для применения у людей, защищают путем индукции выработки специфических антител. Выработка антител обычно определяется в сыворотке или плазме крови с использованием серологических анализов, включая ИФА и функциональные тесты (тесты на агглютинацию, опсонофагоцитарная реакция и активация комплемента, тесты на токсин и нейтрализацию вируса). Однако из-за анатомической компартментализации адаптивной иммунной системы измерение титров антител в сыворотке (или плазме) крови может не предсказать клиническую эффективность или даже местную иммуногенность, особенно для вакцин против инфек-

ций слизистой оболочки, в которых защита часто опосредуется локальным ответом [6].

Как правило, вторичный ответ гуморальной системы иммунитета, индуцируемый большинством инъектируемых вакцин, измеряется при максимальном уровне специфических антител, который наблюдается в сыворотке крови через 4–6 недель после иммунизации, и такой ответ может сохраняться довольно долго из-за циркуляции в крови сывороточных иммуноглобулинов в течение довольно длительного времени (от одной до нескольких недель, в зависимости от изотипа иммуноглобулина). В отличие от титров антител в сыворотке крови ответы ASC достигают максимума намного раньше (6–8 сут) и исчезают из крови в течение нескольких суток, что делает их измерение независимым от предшествующих иммунизаций той же вакциной. Измерение ответов ASC представляется более дискриминационным, чем измерение титров сывороточных антител, особенно вторичных или бустерных ответов, поскольку частоты ASC до и после последней иммунизации незначительно изменяются по сравнению с соответствующими ответами вторичных антител сыворотки. Последний тип гуморального ответа может быть измерен только после того, как соответствующий титр антител значительно увеличился по сравнению с титром перед вакцинацией, называемым «серологическим исходным уровнем» [5].

Следовательно, измерение ASC, временно мигрирующих в кровотоки, наиболее доступный лимфоидный компартмент, вероятно, представляет собой мощный и дискриминирующий инструмент для оценки ранней стадии гуморального эффекторного иммунного ответа.

В-клеточный ELISPOT для сопровождения исследований вакцин против COVID-19 также может быть разработан и выпускаться промышленными партиями биотехнологическими компаниями. Такие наборы для исследовательских целей уже используются (рис. 1). В-клеточные наборы ELISPOT позволяют количественно определять специфические для SARS-CoV-2 В-клетки памяти, даже когда уровни антител начинают снижаться. Например, в случае малярии было показано, что уровни антител падают ниже предела обнаружения через 1 год после первичной инфекции, тогда как уровни В-клеток памяти остаются постоянными [7]. Возможность определения гуморального ответа на SARS-CoV-2, даже в отсутствие титров антител, будет иметь большое значение для понимания механизмов формирования долгосрочного иммунитета к COVID-19.

Т-клеточные ответы на SARS-CoV-2 и методы их исследования

До настоящего времени нет достаточной ясности, почему COVID-19 протекает так различно, от бессимптомного до критического, приводящего к смерти пациента. Остается актуальным вопрос, почему даже при близком контакте с больными некоторые люди не заболевают. Безусловно, сопутствующие заболевания во многом объясняют неблагоприятный прогноз в ряде случаев. Однако очевидно, что за легкое и бессимптомное течение, а особенно за резистентность к инфекции, ответственна в первую очередь иммунная система пациента. Может ли такая вариабельность формироваться за счет различий Т-клеточного иммунного ответа, в том числе из-за перенесенных ранее «простудных» инфекций, вызванных другими коронавирусами?

При изучении вирусных инфекций традиционно особое внимание уделяется гуморальному иммунитету — появлению в крови антител (IgM, IgG) к вирусным антигенам. Однако в борьбе с вирусными инфекциями существенную, а во многих

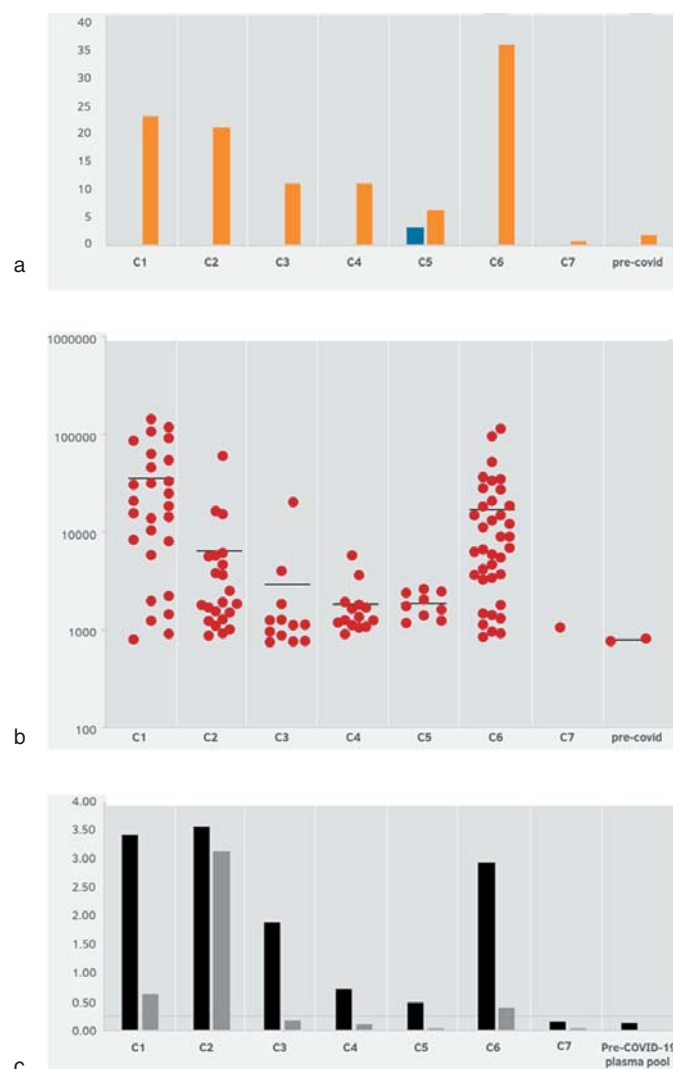


Рис. 1. Определение количества специфичных для RBD спайк-белка В-клеток и титр антител к RBD. Семь пациентов с инфекцией COVID-19, подтвержденной ранее методом ПЦР, сдали кровь после выздоровления от COVID-19 легкой или средней тяжести. Выделенные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выздоровевших пациентов были стимулированы R848 и рекомбинантным IL-2. После предварительной стимуляции клетки инкубировали в анти-IgG планшете FluoroSpot (флуоресцентный вариант метода ELISPOT). IgG, специфичные для RBD, были детектированы конъюгатом RBD-550. Частота секретирующих IgG клеток, измеренная как пятнообразующие единицы (SFU), показана на рисунке а, относительная площадь каждого пятна — на рисунке б. IgG, специфичные для RBD, были проанализированы с помощью ИФА. (а) FluoroSpot (SFU) человеческих IgG к RBD, (б) FluoroSpot (RSV) человеческих IgG к RBD, (в) ИФА человеческих IgG к SARS-CoV-2.

По оси абсцисс (рис. а–с): C1–C7 — индивидуальные пациенты; pre-COVID-19 plasma pool — собранный до пандемии COVID-19 пул плазмы; pre-covid — собранные до пандемии COVID-19 образцы МКПК.

По оси ординат: количество «пятен» в лунке FluoroSpot (В-клеточный ELISPOT) (рис. а), относительный размер пятен (рис. б), оптическая плотность в ИФА (рис. в).

■ без антигена, ■ антиген RBD (рис. а), ■ разведение плазмы крови 1:100, ■ разведение плазмы крови 1:1000 (рис. в).

Рисунок воспроизведен с модификациями и с разрешения компании Мабтек¹.

Fig. 1. Determination of the number of spike protein RBD-specific B-cells and the anti-RBD antibody titer. Seven individuals, previously PCR-confirmed for COVID-19, donated blood after recovering from mild to moderate COVID-19 disease. Isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of the recovered patients were stimulated with R848 and recombinant IL-2. After pre-stimulation, the cells were incubated on an anti-IgG FluoroSpot plate (a fluorescent variation of the ELISPOT assay). RBD-specific IgGs were detected using the RBD-550 conjugate. The number of IgG-secreting cells measured as spot forming units (SFUs) is shown in the top graph a, and the relative area of each spot is shown in the middle graph b. RBD-specific IgGs were analysed using ELISA.

(a) FluoroSpot (SFU) assay of human IgGs specific to RBD, (b) FluoroSpot (RSV) assay of human IgGs specific to RBD, (c) Enzyme immunoassay (EIA) of human IgGs specific to SARS-CoV-2.

X-axis (graphs a–c)—C1–C7 denote individual patients; pre-COVID-19 plasma pool—plasma pooled before the COVID-19 pandemic; pre-covid—PBMCs collected before the COVID-19 pandemic.

Y-axis—number of spots in a FluoroSpot (B-cell ELISPOT) well (graph a), relative areas of the spots (graph b), EIA absorbance (graph c).

■ no antigen, ■ RBD antigen (graph a), ■ blood plasma 100× dilution, ■ blood plasma 1000× dilution (graph c).

The figure is reproduced with modifications and with permission from Mabtech¹.

¹ <https://www.mabtech.com/knowledge-center/applied-research/covid-19>

случаях и главную роль, играет клеточный иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами. Фрагменты белков патогена представляются на своей мембране антиген-презентирующими клетками и распознаются Т-клетками с помощью Т-клеточных рецепторов (TCR) в комплексе с корецепторами (CD4 для Т-хелперов и CD8 для цитотоксических Т-киллеров).

Известно, что для SARS-CoV 2002/03 (атипичной пневмонии) ответы CD4⁺ Т-клеток на белок S коронавируса, как правило, были связаны с положительными исходами [8]. Изучение клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 в настоящее время находится на начальном этапе.

На основании результатов лабораторных исследований биоматериалов госпитализированных пациентов показано, что специфические Т-клеточные ответы против SARS-CoV важны для распознавания и уничтожения инфицированных клеток, особенно в легких инфицированных людей [9].

В результате исследований 128 случаев коронавирусных инфекций (прежде всего SARS и MERS) установлено [10], что количество и степень активации CD8⁺ Т-клеток в этих случаях были больше, чем ответы CD4⁺ Т-клеток. Однако вопрос о том, достаточно ли ответа Т-клеток памяти для защиты от повторной инфекции, нуждается в дальнейшем изучении. Кроме того, вирус-специфические Т-клетки при тяжелом протекании инфекции SARS/MERS, как правило, имели центральный фенотип памяти со значительно более высокой частотой полифункциональных CD4⁺ Т-клеток, секретирующих цитокины IFN γ , TNF α и IL-2, и CD8⁺ Т-клеток, секретирующих IFN γ , TNF α , а также дегранулированное состояние по сравнению с вирус-специфическими Т-клетками при легких инфекциях. Сильные Т-клеточные ответы связаны с более высоким титром нейтрализующих антител, в то время как у умерших пациентов была диагностирована повышенная секреция цитокинов Th2 в сыворотке крови, например IL-4, IL-5, IL-10 (что увеличивает выработку антител). В отличие от снижения уровня антител в сыворотке крови у пациентов, цитотоксические Т-лимфоциты, специфически реагирующие на коронавирусный антиген (N-белок), все еще обнаруживаются в периферических мононуклеарах выздоровевших пациентов с SARS или MERS более чем через 10 лет после заражения. Этот факт, будучи подтвержденным для COVID-19, указывает на необходимость разработки для текущей пандемии таких вакцин, которые способны вызывать не только гуморальный, но и более стойкий клеточный иммунитет.

В ряде работ указывалось [11, 12], что у большинства пациентов с COVID-19 развивалась лимфопения, а в тяжелых случаях — пневмония с высокими уровнями провоспалительных цитокинов в плазме крови. Это свидетельствует не только о том, что сама иммунная система подвергается атаке в ходе данного заболевания, но и о том, что определенная реакция иммунной системы может усугублять течение болезни. Ранее сообщалось, что у пациентов, инфицированных SARS-CoV или MERS-CoV, обнаруживался гуморальный ответ, то есть выработка специфических антител, но также была отмечена дефектная экспрессия интерферона I и II типа, что свидетельствует о слабых защитных иммунных реакциях [13, 14]. Однако до настоящего времени не проведено достаточного количества исследований по характеристике иммунных реакций, особенно адаптивных, на инфекцию COVID-19. В отдельных публикациях показано, например, что выявляются специфические антитела к нуклеокапсидному белку (NP, N-белку) и S-белку (но не к М-белку), причем IgM достигают пика на 9-е сутки после начала заболевания, а затем на 2-й неделе выявляются IgG, что предполагает участие гуморального иммунитета [15]. Специфический ответ Т-лимфоцитов на SARS-CoV-2 еще недостаточно изучен.

Несмотря на то что большинство выздоровевших пациентов имеют защитный гуморальный иммунитет к SARS-CoV-2, появляются данные о том, что у значительной части выздоравливающих от COVID-19 людей отсутствуют нейтрализующие антитела [16]. По-видимому, иммунитет обеспечивается Т-лимфоцитами. Вполне вероятно, для оценки напряженности иммунитета («иммунного паспорта») пациента потребуется анализировать именно Т-клеточный ответ.

В работе Chen Dong [17] было показано, что противовирусные Т-клетки могут не сохраняться в больших количествах в популяции периферических мононуклеаров у выздоровевших пациентов. При анализе статуса иммунитета всех пациентов в исследованной выборке была установлена значительная корреляция между титрами нейтрализующих антител и количеством NP-специфических Т-клеток (определенное с помощью ELISPOT). Это указывает на то, что развитие нейтрализующих антител может коррелировать с активацией противовирусных Т-клеток. Таким образом, для эффективного клиренса вируса могут потребоваться совместные гуморальные и клеточные иммунные ответы. Именно в этом, одном из первых анализов иммунитета к COVID-19, было показано, что гуморальный и клеточный его компоненты обнаруживаются у значительной части недавно выздоровевших пациентов (но не у всех детектируются оба), и, очевидно, иммунная реакция обеспечивает выздоровление. Однако при последующем, повторном анализе иммунитета у этих же пациентов были обнаружены высокие титры антител IgG наряду с низким уровнем вирус-специфических Т-клеток. Было высказано предположение, что Т-клетки могут перейти в состояние покоя. Последующие работы, например, T. Sekine с соавт. [18], несколько скорректировали это пессимистическое наблюдение.

Hong-Yi Zheng с соавт. показали, что истощение и сниженное функциональное разнообразие Т-клеток в периферической крови могут предсказывать серьезное ухудшение состояния пациентов с COVID-19 [19]. В подобных публикациях [18, 20–22] подчеркивается, что необходим дальнейший анализ защитного иммунитета к данной инфекции для понимания патогенеза COVID-19, особенно в тяжелых случаях. Это также имеет значение при разработке эффективной вакцины для защиты и лечения инфекции COVID-19.

Особенности Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 и его мишени у пациентов с COVID-19 и здоровых людей. К вопросу о разработке оптимальной вакцины

Немецкие ученые проверили встречаемость и характеристики CD4⁺ Т-клеток, реагирующих на S-белок SARS-CoV-2, в крови пациентов с COVID-19 и у здоровых людей, серонегативных по SARS-CoV-2, то есть без антител к данному коронавирусу [20]. Выделенные лимфоциты участников исследования стимулировали пептидами, соответствующими различным фрагментам S-белка. Участки, расположенные ближе к С-концу белка нового коронавируса, имеют больше гомологии с четырьмя коронавирусами, вызывающими обычную простуду у людей (HCoV-229E, -NL63, -OC43, -HKU1), по сравнению с участками из N-конца белка. Однако рецептор-связывающий домен S-белка (RBD), который является мишенью для большинства нейтрализующих вирус антител, располагается ближе к N-концу.

Из 18 пациентов с COVID-19 у 12 были обнаружены Т-клетки, реагирующие на пептиды N-конца S-белка, у 15 (83%) — на пептиды из С-конца. У пациентов, в крови которых реагирующие на данные пептиды Т-клетки не были обнаружены, болезнь, как правило, протекала тяжелее.

У части здоровых доноров (у 24 из 68, то есть 34%) были обнаружены S-реактивные CD4⁺ Т-клетки, к пептидам из N-конца белка — всего у 6 человек (8,8%). Таким образом, Т-клетки здоровых людей, реагирующие на белок нового коронавируса, в основном специфично распознают эпитопы на С-конце, который более сходен с белками «простудных коронавирусов» HCoV-229E, -NL63, -OC43, -HCU1. Часть здоровых участников исследования протестировали на антитела к «простудным коронавирусам» и обнаружили антитела к ним у всех, независимо от наличия S-реактивных Т-клеток.

Однако нельзя ставить знак равенства между Т-клетками здоровых пациентов, реагирующих в тесте *in vitro* на антигены SARS-CoV-2, и таковыми у недавно переболевших COVID-19. Факт специфического распознавания антигенов коронавируса еще не свидетельствует об активной иммунной защите или даже о ее реальном потенциале. S-белок-реактивные CD4⁺ Т-клетки от пациентов с COVID-19 отличались от клеток здоровых доноров еще и тем, что коэкспрессировали более высокие уровни белков CD38 и HLA-DR, что указывает на их недавнюю активацию *in vivo*.

Исследование J. Braun с соавт. [20] является первым прямым исследованием Т-клеточных ответов на SARS-CoV-2. Была показана потенциальная возможность кросс-реактивного клеточного иммунитета к новой коронавирусной инфекции, то есть иммунного ответа у тех, кто ранее переболел сезонными коронавирусами. Авторы предполагают, что такой иммунитет может быть у сравнительно большой доли населения, поскольку считается, что коронавирусные респираторные инфекции широко распространены, по крайней мере, в регионах с умеренным климатом, где инфекции HCoV имеют зимнюю сезонность. Эпидемиологические наблюдения свидетельствуют о том, что взрослый человек заражается одним из четырех известных «простудных» HCoV в среднем каждые 2–3 года [23]. При такой расчетной частоте заболевания титр защитных антител может существенно снизиться, но клеточный иммунитет с высокой вероятностью останется [2, 24].

Не исключено, что эта кросс-реактивность вносит вклад в более легкое протекание COVID-19 у детей и молодежи, поскольку большее число социальных контактов, посещение детских учреждений и учебных заведений увеличивает шанс переболеть «коронавирусной простудой».

Как долго сохраняются гуморальный и клеточный иммунитет к COVID-19, в настоящее время неизвестно. Нейтрализующие антитела к SARS-CoV ассоциируются с выздоровлением, и они обнаруживаются даже через 12 месяцев после заболевания. Однако персистирование нейтрализующих антител к новому коронавирусу SARS-CoV-2 в настоящее время остается неизвестным. Титр антител против «простудных» HCoV может снижаться в течение нескольких месяцев после заражения, хотя повторное заражение HCoV сопровождается низким уровнем вирусемии и коротким периодом выделения вируса, легкими симптомами, что указывает на наличие остаточного иммунитета [24]. В этом контексте клеточный иммунитет еще не изучен. Как и в какой степени специфический гуморальный или клеточный иммунитет к COVID-19 обеспечивает долговременную защиту от повторного заражения, неизвестно, но поиск ответа на этот вопрос станет одной из важнейших задач исследований в ближайшие месяцы.

В работе A. Grifoni с соавт. [25] эпитопы Т-клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 и его особенности были исследованы более подробно. Авторами отмечен факт наличия Т-клеточного ответа у существенной части (40–60% всего исследованного пула) не инфицированных новым коронавирусом здоровых людей.

Для определения доминантных Т-клеточных эпитопов использовались «мегапулы» синтетических пептидов, которые были созданы с применением биоинформатических методов, чтобы с большей вероятностью соответствовать Т-клеточным эпитопам белков SARS-CoV-2. Была проведена функциональная валидация предсказанных эпитопов с использованием МКПК выздоравливающих пациентов COVID-19. Важно, что МКПК группы здоровых доноров были собраны и законсервированы в 2015–2018 гг., что исключает попадание образцов пациентов с ложноотрицательными тестами на SARS-CoV-2. Было обнаружено, что иммунодоминирующий паттерн существенно отличается от таковых у предыдущих тяжелых коронавирусных инфекций, SARS и MERS. В частности, белки М, спайк (S) и N распознавались Т-клетками у всех пациентов, включенных в исследование. Существенная часть Т-клеточных ответов была также направлена на эпитопы белков nsp3, nsp4, ORF3a, ORF7a, nsp12 и ORF8. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что если вакцина будет состоять только из S-белка, она, конечно, вызовет CD4⁺ Т-клеточный ответ, специфичный к SARS-CoV-2, но включение дополнительных структурных антигенов, таких как белки М и N, приблизит ответ на вакцинацию к естественному Т-хелперному ответу, наблюдающемуся у пациентов с незначительной или умеренной тяжестью протекания болезни COVID-19.

Что касается ответов CD8⁺ Т-клеток на SARS-CoV-2, распределение иммунодоминантных мишеней, продемонстрированное в работе A. Grifoni с соавт. [25], отличалось от данных литературы по другим коронавирусам. S-белок был мишенью для ответов CD8⁺ Т-клеток, но не доминантной. М-белок распознавался точно так же, и значительная реактивность была отмечена для других антигенов, в основном nsp6, ORF3a и N, которые в среднем составляли почти 50% от общего ответа CD8⁺ Т-клеток.

Таким образом, эти данные указывают на то, что вакцины-кандидаты против COVID-19, в которых использован в качестве антигена только S-белок, будут вызывать относительно узкий диапазон ответов CD8⁺ Т-клеток по сравнению с естественным ответом CD8⁺ Т-клеток, наблюдаемым при легком и умеренном заболевании COVID-19. Оптимальная с точки зрения ответа Т-киллеров вакцина может быть получена при использовании дополнительных эпитопов класса I, таких как полученные из М, nsp6, ORF3a и/или N белков.

Существуют опасения относительно увеличения тяжести заболевания вследствие вакцинации, если вакцина будет вызывать так называемый эффект антителозависимого усиления проникновения вируса в клетку (ADE) или развитие ответов по типу Th2 [26]. Эти опасения можно считать частично снятыми, поскольку A. Grifoni с соавт. [25] наблюдали преобладающие ответы типа Th1 у выздоравливающих пациентов COVID-19, с небольшим уровнем или отсутствием цитокинов, характерных для Th2.

Таким образом, накапливаются данные о том, что некоторые здоровые не болевшие COVID-19 доноры имеют Т-клетки, специфичные к антигенам SARS-CoV-2, к S-белку в частности. Результаты, полученные коллективом российских ученых, включая одного из авторов настоящего обзора [21], в целом подтверждают это с оговоркой, что в данной работе авторы наблюдали значительное увеличение количества реагирующих на S-белок Т-клеток у отобранных во время пандемии COVID-19 здоровых доноров в сочетании с полным отсутствием специфических антител к SARS-CoV-2 в этой группе. Это свидетельствует о том, что некоторые доноры могли иметь контакт с SARS-CoV-2 до забора крови. Из-за перекрестной реактив-

ности, вызванной другими коронавирусами, Т-клетки могли защитить таких условно здоровых доноров от развития полномасштабной инфекции. Это иллюстрируется случаем пациента p1477 (рис. 2), который проживал совместно с пациентом с COVID-19, но вирус у p1477 не выявлялся в нескольких последовательных тестах ПЦР; p1477 не имел никаких типичных или гриппоподобных симптомов COVID-19 и у него не обнаруживались антитела к любому из антигенов SARS-CoV-2. Авторы процитированной работы также считают, что эта гипотеза тем не менее должна быть подтверждена на большей когорте доноров. На момент написания данной работы опубликована статья F. Gallais с соавт. [27], в которой описаны Т-клеточные ответы на SARS-CoV-2, детектированные ELISPOT, у членов семей больных COVID-19. Примечательно, что у части исследуемых был обнаружен выраженный Т-клеточный ответ, но не только без сероконверсии, но и с отрицательным тестом ПЦР на РНК вируса. Данный факт свидетельствует не только о том, что эпидемиологические данные, полагающиеся только на присутствие антител к SARS-CoV-2, приводят к недооценке распространения инфекции, но и о том, что часть пациентов может эффективно справиться с инфекцией на начальной стадии без их выработки.

Вопрос кросс-реактивности иммунитета

В работе А. S. Shomuradova с соавт. [21] использовался метод ELISPOT, детектирующий секрецию IFN γ при стимуляции антигеном в качестве критерия для определения антигенспецифических клеток. Существуют и другие способы оценки реактивности Т-клеток, особенно CD4 $^{+}$ Т-клеток. Таким образом, есть опасность, что детекция именно IFN γ в тесте ELISPOT (IGRA) может потенциально пропустить некоторые реагирующие Т-клетки, секретирующие другие цитокины. Но анализ результатов предыдущих исследований показал, что CD4 $^{+}$ Т-клетки реагируют на стимуляцию антигенами SARS-CoV-2 ответом Th1-типа [28]. В другом исследовании IFN γ также

был преобладающим цитокином, продуцируемым Т-клетками памяти после стимуляции пептидами белков SARS-CoV-2 [29].

Как уже отмечалось, описанный в первой подобной работе J. Braun с соавт. [20] Т-клеточный иммунный ответ у здоровых доноров сфокусирован преимущественно на эпитопах в С-концевой части S-белка SARS-CoV-2, что может объясняться более высокой гомологией этого региона с «простудными коронавирусами». В исследовании А. S. Shomuradova с соавт. [21] только один эпитоп (YLQ) был получен из N-концевой части S-белка, авторы практически не наблюдали Т-клеточного ответа на этот эпитоп у здоровых доноров.

Что касается значения кросс-реактивных Т-клеток, иммунологические исследования пандемий гриппа могут быть поучительными и дать обнадеживающие аналогии. В контексте пандемии гриппа H1N1 2009 г. ранее приобретенный Т-клеточный иммунитет существовал во взрослой популяции и был сосредоточен на более консервативных внутренних вирусных белках гриппа [30]. Было обнаружено, что наличие кросс-реактивных Т-клеток коррелирует с менее тяжелым течением заболевания [31, 32]. Частая встречаемость кросс-реактивных ответов Т-клеток памяти, возможно, была одним из факторов, способствующих меньшей степени тяжести пандемии гриппа H1N1 [33]. Кросс-реактивный иммунитет к штаммам вируса гриппа был смоделирован как критический фактор, влияющий на восприимчивость к новым, потенциально пандемическим, штаммам вируса гриппа [34]. Учитывая серьезность продолжающейся пандемии COVID-19, будет логичным предположить, что любая степень перекрестного защитного иммунитета к коронавирусу среди населения может иметь существенное влияние на общее течение пандемии и эпидемиологическую динамику в течение многих следующих лет [35].

Все эти результаты дают решающее обоснование для начала глобальных проспективных исследований для оценки вклада ранее существовавшего кросс-реактивного иммунитета к COVID-19, учитывая потенциальные региональные различия,

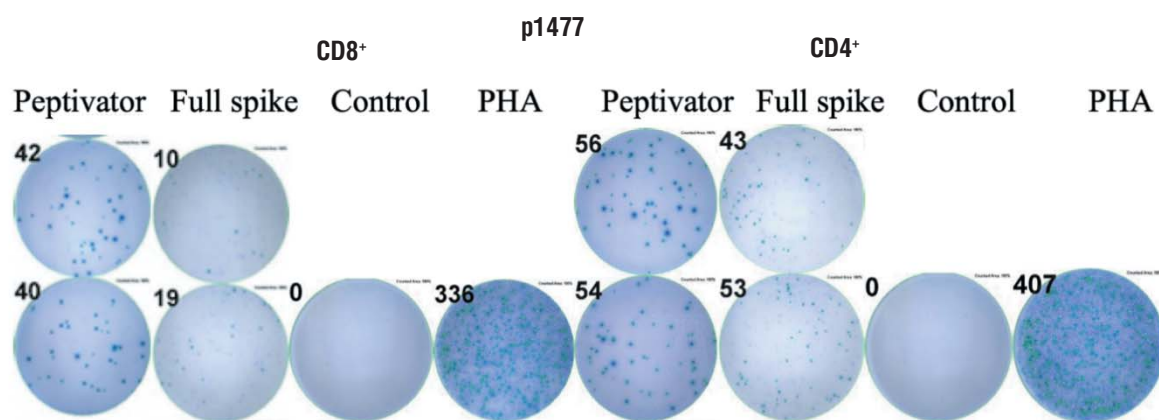


Рис. 2. Пример IFN γ ELISPOT анализа Т-клеток, выделенных из крови условно здорового донора, близко контактировавшего с больным COVID-19. Выделенные CD4 $^{+}$ или CD8 $^{+}$ Т-клетки были активированы различными вариантами антигенов SARS-CoV-2. Цифры рядом с фотографиями лунок обозначают количество Т-клеточных пятен (spots). Peptivator — пул синтетических пептидов, покрывающих большую часть последовательности спайк-белка (S-белка) SARS-CoV-2 (Miltenyi Biotec, Германия), Full spike — полноразмерный рекомбинантный S-белок, Control — контроль без активации антигенами, PHA — положительный контроль активации всех функционально активных Т-клеток с помощью фитогемагглютинаина (Г. А. Ефимов, неопубликованные данные).

Fig. 2. An example of IFN γ ELISPOT assay of T-cells isolated from the blood of a presumably healthy donor who had had close contact with a COVID-19 patient. Isolated CD4 $^{+}$ or CD8 $^{+}$ T-cells were activated by different versions of SARS-CoV-2 antigens. The numbers beside the wells' photos show the number of T-cell spots. Peptivator—a pool of synthetic peptides covering most of the SARS-CoV-2 spike protein (S-protein) sequence (Miltenyi Biotec, Germany), Full spike—recombinant full-length S-protein, Control—control without antigen stimulation, PHA—positive activation control of all functionally active T-cells with phytohemagglutinin (G. Efimov, unpublished results).

в клинические исходы инфекции COVID-19. Наряду с введенными в настоящее время новыми серологическими тестами данные, полученные в результате таких исследований, могут дать критическую информацию для обоснованной оценки риска, мониторинга пациентов, адаптации методов эпидемического сдерживания и, что не менее важно, разработки вакцин.

Вопросы защитного иммунитета после перенесенной инфекции COVID-19. Роль Т-клеточного анализа и уровня IgG

SARS-CoV-2 способен вызывать тяжелый острый респираторный синдром, при котором иммунная система является частью процесса клинической эволюции, от первых симптомов ОРВИ до тяжелого поражения легких, вызванного воспалительным ответом, таким как цитокиновый шторм и активация макрофагов и нейтрофилов [36, 37]. В ряде исследований уже представлена информация об иммунном ответе во время этой инфекции, который включает выработку антител и активацию Т-лимфоцитов, но эти данные в основном ограничены исследованиями госпитализированных пациентов, то есть с подтверждением наличия вируса и выраженными симптомами. Было показано, что у выздоровевших госпитализированных пациентов титр антител увеличивается после первой недели с момента появления симптомов, что дает возможность предположить положительную корреляцию гуморального ответа с тяжестью заболевания [38, 39]. При этом наблюдается также активация Т-клеток и увеличение доли Т-клеток с центральным фенотипом памяти после 14 суток госпитализации [28, 40].

Если мы полагаем, что защиту от инфекции обеспечивает иммунитет, возникают вопросы, кто нуждается и не нуждается в изоляции или мониторинге на основании выявленного иммунного статуса. Негоспитализированное или неизолированное население считается вирусным хозяином, поскольку способствует распространению вируса. Другой проблемой текущей пандемии являются бессимптомные случаи, особенно у медицинских работников в больнице, что способствует распространению инфекции. Очевидной мерой противодействия распространению вируса является социальное дистанцирование и массовое тестирование. Массовое тестирование в настоящий момент в основном сфокусировано на обнаружении антител и РНК вируса с помощью ПЦР. Увеличивается количество описанных случаев отсутствия существенных титров защитных IgG при подтвержденной молекулярными методами (ПЦР) инфекции. Кроме того, нередки случаи обнаружения низких титров или полного отсутствия нейтрализующих антител даже у госпитализированных пациентов [38, 39]. Что же является защитным иммунитетом в случае SARS-CoV-2 и какое время требуется для ограничения социальных контактов или карантинных мер?

Как уже показано в ряде исследований, включая процитированные в данной статье, Т-клетки могут быть ключом к решению этой дилеммы. Несмотря на опубликованные данные о том, что вирус может вызывать лимфопению и вызывать задержку активации Т-клеток в первые сутки инфекционного процесса, после примерно двух недель от первых симптомов в периферической крови начинают появляться специфические для SARS-CoV-2 Т-клетки с фенотипами иммунной памяти (это центральная память для CD4⁺ и эффекторная память для CD8⁺ лимфоцитов) [28].

Чаще всего эффективность вакцин оценивалась по гуморальному ответу, но уже есть некоторые вакцины, предназна-

ченные в основном для активации Т-клеток, что обеспечивает надежный ответ Т-клеток памяти, но исследования таких вакцин все еще находятся на доклинической стадии. Опубликованы результаты наблюдений изменения статуса противовирусного иммунитета в ходе вакцинации против гепатитов А и В, когда титры антител не имели отношения к защитному статусу, поскольку именно Т-клетки памяти могли активироваться и защищать людей от инфекции [41, 42]. Если верна недавно высказанная гипотеза о том, что новый коронавирус способен снижать активность В-клеток, тесты на активацию Т-клеток и вакцины, направленные на стимуляцию Т-клеток памяти, приобретают особое значение [43]. Этот вопрос должен быть дополнительно изучен.

Возможно, ответ на вопрос о достаточности иммунной защиты заключается в анализе клеточного ответа, в поиске максимально подходящего лабораторного анализа, стоимость которого сравнима с тестами на нейтрализующие антитела или даже ниже. Как только мы сможем оценить достаточную субпопуляцию, которая не продуцирует антитела класса IgG, но имеет активируемые Т-клетки после заболевания или вакцинации (или даже вследствие кросс-реактивного иммунитета), этого будет достаточно, чтобы гарантировать защитный иммунитет. Анализы Т-клеток имеют высокую специфичность и чувствительность. Существует много методов анализа Т-клеточного иммунитета, например оценка пролиферации с использованием вирусных частиц в качестве стимуляторов и др. [44], но, пожалуй, наиболее приемлемым по соотношению затрат и получаемой информации является, по нашему мнению, метод ELISPOT. Т-клеточный ELISPOT может помочь в оценке иммунитета населения (госпитализированного, изолированного или неизолированного), и этот анализ будет возможен в странах, имеющих специализированные иммунологические лаборатории, включая Россию. Кроме того, такого рода клеточные анализы предоставят информацию, которая будет полезна для разработки вакцины для предотвращения и мониторинга этого вирусного заболевания. Данное мнение разделяют не только авторы настоящего обзора, но и члены международного консорциума, посвященного иммунологии COVID-19, возглавляемого М. Маойером² (персональное сообщение), и находит свое отражение в научной периодике [43].

Адаптацией технологии ELISPOT под нужды исследования иммунитета и борьбы с COVID-19 уже занимаются несколько зарубежных и отечественных биотехнологических компаний. Примеры анализа приведены на рисунках 1–3.

Показано, что количество специфических для SARS-CoV-2 Т-клеток может и не коррелировать с титрами антител (рис. 2). Пациент С7, не имевший специфических антител к SARS-CoV-2 по результатам ИФА, но с присутствием сильного Т-клеточного ответа, также не имел обнаруживаемых В-клеток памяти на RBD S-белка SARS-CoV-2 (рис. 2, 3). Таким образом, подтверждается результат в образцах сыворотки крови пациента С7 в параллельно проведенном ИФА: у индивидуума не было В-клеток, секретирующих RBD-специфический IgG. Организм пациента С7 с подтвержденным COVID-19 (методом ПЦР, клинической картиной заболевания) противостоял инфекции, несмотря на то что его иммунная система не мобилизовала никаких RBD-специфических IgG-секретирующих В-клеток. Очевидно, что иммунитет этого человека к коронавирусу достиг защитного статуса, используя другую составляющую, а именно Т-клеточный иммунитет, что и подтверждается соответствующим тестом ELISPOT.

² <https://www.fchampalimaud.org/covid19>

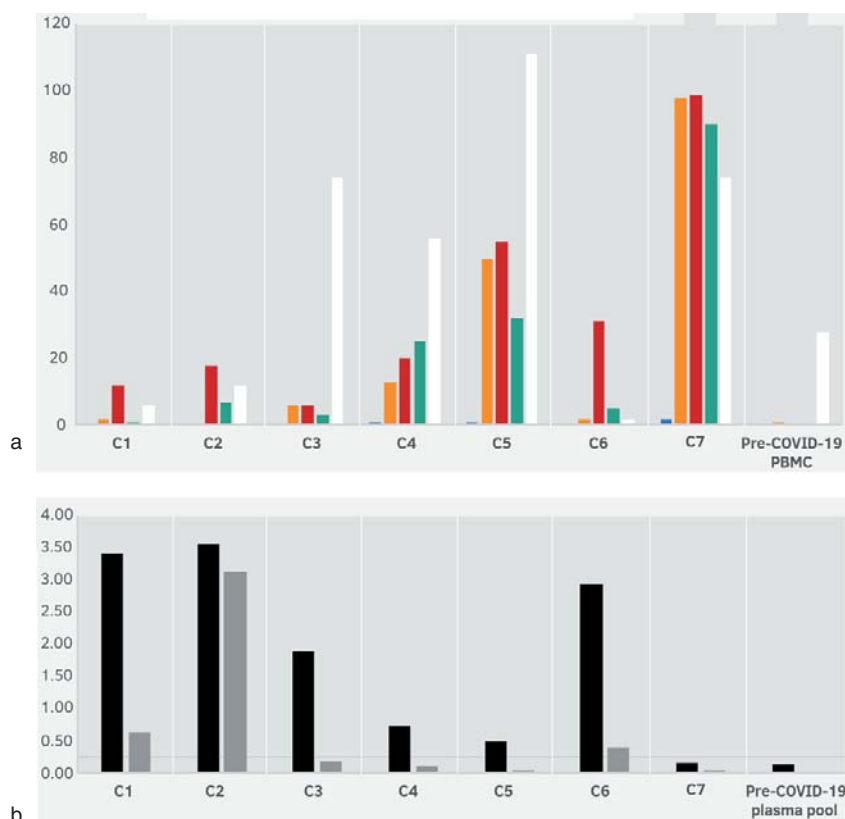


Рис. 3. Определение количества специфичных для SARS-CoV-2 Т-клеток и соответствующих титров антител. Семь пациентов с инфекцией COVID-19, подтвержденной ранее ПЦР, сдали кровь после выздоровления от COVID-19 легкой или средней тяжести. Выделенные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выздоровевших пациентов были стимулированы пептидным пулом SARS-CoV-2 (15-членные пептиды с перекрытием в 11 аминокислот, покрывающие последовательность нуклеокапсидного белка или домены S1 и S2 спайк-белка). Т-клеточный ответ анализировали с помощью флуоресцентного варианта метода ELISPOT — FluoroSpot. Дополнительно иммуноглобулины класса G (IgG), специфичные для RBD домена спайк-белка SARS-CoV-2, были определены с помощью ИФА.

(a) FluoroSpot человеческих INF γ /IL-2, (b) ИФА человеческих IgG к SARS-CoV-2.

По оси абсцисс (рис. а–b): C1–C7 — индивидуальные пациенты; pre-COVID-19 plasma pool — собранный до пандемии COVID-19 пул плазмы; pre-COVID-19 PBMC — собранные до пандемии COVID-19 образцы МКПК.

По оси ординат: количество «пятен» в лунке ELISPOT (рис. а), оптическая плотность в тесте ИФА (рис. б).

■ отрицательный контроль, без стимуляции МКПК антигенами, ■ стимуляция МКПК пептидными антигенами SARS-CoV-2 нуклеокапсидного белка, ■ стимуляция МКПК пептидными антигенами SARS-CoV-2 S1 части спайк-белка, ■ стимуляция МКПК пептидными антигенами SARS-CoV-2 S2 части спайк-белка, □ контроль выброса IFN γ всеми функционально активными Т-клетками, с помощью фитагемагглютина (рис. а), ■ разведение плазмы крови 1:100, ■ разведение плазмы крови 1:1000 (рис. б).

Рисунок воспроизведен с модификациями и с разрешения компании Мабтек³.

Fig. 3. Determination of the number of SARS-CoV-2-specific T-cells and corresponding antibody titers. Seven individuals, previously PCR-confirmed for COVID-19, donated blood after recovering from mild to moderate COVID-19 disease. Isolated PBMCs were stimulated with a SARS-CoV-2 peptide pool (15-mer peptides with an overlap of 11 amino acids, covering the nucleocapsid protein or S1 and S2 domains of the spike protein). The T-cell response was analysed using a FluoroSpot assay, the fluorescent variation of the ELISPOT assay. Additionally, IgGs specific to RBD of the SARS-CoV-2 spike protein S2 domain were analysed using ELISA.

(a) FluoroSpot assay of human INF γ /IL-2, (b) EIA of human IgGs specific to SARS-CoV-2.

X-axis (graphs a–b)—C1–C7 denote individual patients; pre-COVID-19 plasma pool—plasma pooled before the COVID-19 pandemic; pre-COVID-19 PBMC—PBMCs collected before the COVID-19 pandemic.

Y-axis—number of spots in an ELISPOT well (graph a), EIA absorbance (graph b).

■ negative control, PBMCs without antigen stimulation, ■ PBMC stimulation with peptide antigens of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein, ■ PBMC stimulation with peptide antigens of SARS-CoV-2 spike protein S1 domain, ■ PBMC stimulation with peptide antigens of SARS-CoV-2 spike protein S2 domain, □ control of IFN γ release by all functionally active T-cells using phytohemagglutinin (graph a), ■ blood plasma 100 $\times$ dilution, ■ blood plasma 1000 $\times$ dilution (graph b).

The figure is reproduced with modifications and with permission from Mabtech³.

Анализ В-клеток памяти и Т-клеток (рис. 1–3) может быть очень информативным при разработке вакцин: титры антител могут быть не единственным определяющим фактором для

оценки успеха иммунизации. Аффинность Т-клеток и антител также может быть очень важна для понимания механизмов иммунного ответа при исследовании вакцины-кандидата.

³ <https://www.mabtech.com/knowledge-center/applied-research/covid-19>

Задачи, решаемые разработкой и внедрением тестов на основе ELISPOT в системе противозидемических мероприятий при COVID-19, и реализуемость такой разработки для скрининга больших групп населения

Диагностические наборы ELISPOT для количественного определения как специфических для SARS-CoV-2 Т-клеток, так и для секретирующих антитела против вирусных антигенов

В-клеток могут быть использованы для решения ряда задач при изучении SARS-CoV-2 и контроля над заболеваемостью COVID-19 (рис. 4).

Для разработки и серийного выпуска наборов ELISPOT необходимо решить следующие задачи:

- экспериментальный и биоинформатический поиск оптимальных пептидных и/или белковых антигенов, их производство и контроль качества;

Эпидемиологические цели: прогноз и контроль над распространением инфекции и распределение ограниченных медицинских ресурсов (вакцин), снятие ограничений для защищенных людей Epidemiological goals: forecasting of and control over the spread of infection, distribution of limited medical resources (vaccines), lifting restrictions for protected people

- Выявление бессимптомно инфицированных (включая серонегативных) SARS-CoV-2 пациентов
Identification of asymptomatic (including seronegative) SARS-CoV-2 patients
- Выявление потенциально защищенных от инфекции пациентов
Identification of potentially immune patients
- Определение биомаркеров иммунной защиты от COVID-19
Determination of biomarkers of immune response to COVID-19
- Прогнозирование последствий повторного контакта с SARS-CoV-2 (особенно для медицинского персонала). Типирование MHC в группе потенциально хорошо защищенных от COVID-19
Prediction of the consequences of repeated contact with SARS-CoV-2 (especially for medical personnel). MHC typing in the population potentially immune to COVID-19
- Возможно более раннее по сравнению с детекцией анти-SARS-CoV-2 антител выявление COVID-позитивных пациентов (есть примеры из итальянской популяции)
Identification of COVID-positive patients at an earlier stage than detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies, if possible (there have been such cases in the Italian population)
- Выявление длительности анти-SARS-CoV-2 иммунного ответа
Determination of the duration of anti-SARS-CoV-2 immune response

Терапевтические цели Therapeutic goals

- Разработка альтернативного Т-клеточного ELISPOT, который может прогнозировать тяжелое течение болезни, например выработку IL-17 вместо IFN γ
Development of an alternative T-cell ELISPOT assay that could predict severe progression of the disease, e.g. based on determination of IL-17 release instead of IFN γ
- Сравнение антительных и Т-клеточных ответов иммунной системы пациентов в активной стадии болезни. Например, развитие тяжелого течения болезни коррелирует с высокой продукцией TGF β и IL-10, вызывающее преобладание класса IgA над IgG
Comparison of antibody-mediated and T-cell immune responses of patients during the active phase of the disease. For instance, severe progression of the diseases correlates with high TGF β and IL-10 production leading to higher levels of IgA as compared to IgG
- Диагностическая поддержка при высокотехнологичной и затратной терапии (биомедицинские клеточные продукты, антитела к интерлейкинам и т. п.)
Diagnostic support for high-technology and costly therapy (biomedical cell products, antibodies to interleukins, etc.)
- Определение «горячих эпитопов» распознавания:
- разные эпитопы могут быть ассоциированы с разными типами экспозиции вирусом: массивованная однократная, медленная хроническая;
- эпитопы у индивидуумов с тяжелым или умеренным/бессимптомным течением болезни;
- соотношение экспонированных и зараженных, ассоциация эпитопов с отсутствием симптомов и минимальными симптомами
Determination of major recognition epitopes:
- different epitopes may be associated with different types of virus exposure: single mass exposure, slow chronic exposure;
- epitopes in individuals with severe or moderate/asymptomatic disease;
- ratio of exposed and infected individuals, correlation between epitopes and asymptomatic disease or minimal symptoms
- Исследования корреляции Т-клеточного ответа и вирусной нагрузки для выбора тактики терапии
Analysis of correlation between a T-cell response and viral load with a view of treatment strategy selection

Разработка, исследование вакцин и лекарственных средств Development, research of vaccines and medicines

- Идентификация эпитопов SARS-CoV-2, характерных для разных этнических групп
Identification of SARS-CoV-2 epitopes specific to different ethnic groups
- Информированный выбор мишеней для создания вакцин, которые в настоящее время не задействованы в текущих разрабатываемых вакцинах
Informed choice of vaccine targets which are not currently used in the vaccines under development
- Предварительная селекция эпитопов на основании перекрытия с эпитопами SARS-CoV-1, MERS и 4 наиболее распространенных бета-коронавирусов («простудные коронавирусы»)
Preselection of epitopes based on overlaps with epitopes of SARS-CoV-1, MERS, and 4 most common beta-coronaviruses (that cause common cold infections)
- Прямая идентификация эпитопов SARS-CoV-2 с помощью В-клеточного ELISPOT и косвенная с помощью Т-клеточного, поскольку сильные антительные и Т-клеточные эпитопы часто перекрываются (и возможность информирования интернациональных центров о потенциальных эпитопах для нейтрализующих антител)
Direct identification of SARS-CoV-2 epitopes using B-cell ELISPOT assay and indirect identification using T-cell ELISPOT assay, since strong antibody epitopes and T-cell epitopes often overlap (and the possibility of informing international centres about potential epitopes for neutralising antibodies)
- Картирование эпитопов в разных когортах. В случае нахождения «горячих» эпитопов — сиквенс индивидуальных Т- и В-клеточных рецепторов (биотехнологические компании ищут «сильные» клоны В-клеток для терапевтических антительных кандидатов)
Mapping of epitopes in different cohorts. Sequencing of individual T- and B-cell receptors, if major epitopes are observed (biotechnology companies are looking for strong B-cell clones for therapeutic antibody candidates)

Рис. 4. Задачи, решаемые с помощью технологической платформы ELISPOT, и цели, которые могут быть достигнуты с ее помощью для изучения SARS-CoV-2 и контроля над заболеваемостью COVID-19.

Fig. 4. Tasks that the ELISPOT technology platform helps to achieve, and goals that it could help to achieve in the areas of SARS-CoV-2 research and COVID-19 incidence control.

- производство и химическая конъюгация различных моноклональных антител;
- разработка технологии сорбции на иммунологических планшетах антител и антигенов, учитывая требования к сроку годности и стабильности серий наборов. Настройка автоматизированной линии по подготовке и консервации планшетов;
- подбор условий постановки анализа ELISPOT с варьированием принципиальных компонентов и их концентраций;
- валидация анализа, клинико-лабораторные испытания и определение параметров чувствительности, специфичности анализа и межсерийных вариаций;
- промышленный выпуск и контроль качества серий наборов.

В настоящее время некоторые биотехнологические компании наладили выпуск исследовательских наборов Т- и В-клеточных ELISPOT для SARS-CoV-2⁴.

В Российской Федерации технология ELISPOT достаточно хорошо знакома ряду диагностических лабораторий и нашла применение в диагностике туберкулезной инфекции. В АО «Генериум» локализовано производство ELISPOT набора T-SPOT.TB® (компания Oxford Immunotech) для диагностики туберкулеза⁵.

В ряде достаточно оснащенных клинико-диагностических лабораторий метод IGRA-ELISPOT выполняется рутинно (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, ФГБНУ «ЦНИИТ», ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ», ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, частные сети в регионах «Инвитро», «Ситилаб», клинико-диагностические лаборатории компаний ООО «Экзакт Лабс», «ФармЛайн», иммунобиологическая лаборатория АБТ и др.). Освоение метода ELISPOT на COVID-19 не требует переобучения сотрудников или закупки нового оборудования.

Выводы

1. Характер приобретенного иммунитета у пациентов, переболевших COVID-19, особенно в бессимптомной и легкой форме, факторы, указывающие на кросс-реактивность иммунитета, а также описанные случаи отсутствия инфекции у людей, близко контактировавших с заболевшими, позволяют сделать вывод, что Т-клеточный иммунитет играет важнейшую роль в борьбе с вирусом SARS-CoV-2.

2. Наиболее подходящим методом, наряду с тестом на нейтрализующие вирус антитела, позволяющим не только характеризовать иммунный ответ, но и прогнозировать иммунную защищенность к повторным инфекциям или после вакцинации, является IGRA-ELISPOT.

3. Внедрение В- и Т-клеточных ELISPOT-тестов в клинико-лабораторную диагностику позволит качественно усилить следующие направления борьбы с пандемией COVID-19:

- мониторинг иммунологического статуса пациента и выбора тактики лечения;
- определение эффективности защиты гуморального и клеточного иммунитета в случае повторной инфекции переболевших пациентов;
- определение наиболее уязвимых групп населения при повторной инфекции или повторной пандемии COVID-19 и близкородственными штаммами SARS-CoV-2;
- комплексная оценка вакцин в клинических исследованиях и при массовом применении для прогнозирования их эпидемиологической эффективности;
- определение наиболее иммуногенных эпитопов антигенов SARS-CoV-2 при разработке вакцин.

4. Биотехнологические компании имеют готовую технологическую платформу, легко адаптируемую под конкретный вид анализа и патогена, для разработки и промышленного производства наборов ELISPOT.

Вклад авторов. Д. А. Потеряев — анализ данных литературы, написание текста статьи; Р. А. Хамитов — критическое обсуждение, утверждение окончательной версии статьи для публикации; Г. А. Ефимов — предоставление наблюдений и неопубликованных данных, критическое обсуждение текста статьи; А. М. Шустер — разработка концепции, критическое обсуждение текста статьи, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. Dmitry A. Poteryaev—analysed the literature and wrote the paper; Ravil A. Khamitov—reviewed the paper, approved the final version of the paper for publication; Grigory A. Efimov—shared observations and unpublished data, reviewed the paper; Aleksandr M. Shuster—developed the concept of the study, reviewed the paper, approved the final version of the paper for publication.

Благодарности. Авторы благодарны Markus Maeurer (Fundação Champalimaud, Португалия) и Chiara Agrati (Istituto Nazionale Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani, Италия) за обсуждение методов исследования иммунитета к SARS-CoV-2.

Acknowledgements. The authors are grateful to Markus Maeurer (Fundação Champalimaud, Portugal) and Chiara Agrati (Istituto Nazionale Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani, Italy) for discussions of methods used in SARS-CoV-2 immunity studies.

Конфликт интересов. Р. А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Ravil A. Khamitov is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belli-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020;396(10249):467–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)
2. Oi-Wing Ng, Adeline Chia, Anthony T Tan, Ramesh S Jadi, Hoe Nam Leong, Antonio Bertolotti, Yee-Joo Tan. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine*. 2016;34(17):2008–14. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.02.063>
3. Lehmann PV, Zhang W. Unique strengths of ELISPOT for T cell diagnostics. In: Kalyuzhny A, ed. *Handbook of ELISPOT. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol. 792. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. P. 3–23. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-325-7_1
4. Umlauf BJ, Pinsky NA, Ovsyannikova IG, Poland GA. Detection of vaccinia virus-specific IFN γ and IL-10 secretion from human PBMCs and CD8 $^{+}$ T cells by ELISPOT. In: Kalyuzhny A, ed. *Handbook of ELISPOT. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol. 792. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. P. 199–218. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-325-7_16
5. Saletti G, Çuburu N, Yang JS, Dey A, Czerkinsky C. Enzyme-linked immunosorbent assays for direct *ex vivo* measurement of vaccine-induced human humoral immune responses in blood. *Nat Protoc*. 2013;8(6):1073–87. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.058>
6. Kozłowski PA, Cu-Uvin S, Neutra MR, Flanagan TP. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of

⁴ SARS-CoV-2 FluoroSpot and ELISpot kits. <https://www.mabtech.com/news#2989>

T-SPOT® Discovery™ SARS-CoV-2 kit. https://go.oxfordimmunotec.com/t-spot_discovery_SARS-CoV-2

⁵ http://www.generium.ru/about/press_center/company_news/press-release

- antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect Immun*. 1997;65(4):1387–94.
7. Sundling C, Rönnerberg C, Yman V, Asghar M, Jahnmatz P, Lakshminanth T, et al. B cell profiling in malaria reveals expansion and remodelling of CD11c⁺ B cell subsets. *JCI Insight*. 2019;4(9):e126492. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126492>
8. Yue-Dan Wang, Wan-Yee Fion Sin, Guo-Bing Xu, Huang-Hao Yang, Tin-yau Wong, Xue-Wen Pang, et al. T-cell epitopes in severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike protein elicit a specific T-cell immune response in patients who recover from SARS. *J Virol*. 2004;78(11):5612–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5612-5618.2004>
9. Jiang Gu, Encong Gong, Bo Zhang, Jie Zheng, Zifen Gao, Yanfeng Zhong, et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J Exp Med*. 2005;202(3):415–24. <https://doi.org/10.1084/jem.20050828>
10. Rokni M, Ghasemi V, Tavakoli Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: comparison with SARS and MERS. *Rev Med Virol*. 2020;30(3):e2107. <https://doi.org/10.1002/rmv.2107>
11. Dawei Wang, Yimei Yin, Chang Hu, Xing Liu, Xingguo Zhang, Shuliang Zhou, et al. Clinical course and outcome of 107 patients infected with the novel coronavirus, SARS-CoV-2, discharged from two hospitals in Wuhan, China. *Crit Care*. 2020;24(1):188. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02895-6>
12. Li Tan, Qi Wang, Duanyang Zhang, Jinya Ding, Qianchuan Huang, Yi-Quan Tang, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):33. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0148-4>
13. Pak-Yin Lui, Lok-Yin Roy Wong, Cheuk-Lai Fung, Kam-Leung Siu, Man-Lung Yeung, Kit-San Yuen, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus M protein suppresses type I interferon expression through the inhibition of TBK1-dependent phosphorylation of IRF3. *Emerg Microbes Infect*. 2016;5(4):e39. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.33>
14. Park A, Iwasaki A. Type I and type III interferons — induction, signaling, evasion, and application to combat COVID-19. *Cell Host Microbe*. 2020;27(6):870–8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008>
15. Woo PCY, Lau SKP, Wong BHL, Kwok-hung Chan, Chung-ming Chu, Hoi-wah Tsoi, et al. Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(4):665–8. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.4.665-668.2004>
16. Fan Wu, Aojie Wang, Mei Liu, Qimin Wang, Jun Chen, Shuai Xia, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *medRxiv*. 2020.03.30.20047365. <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>
17. Chen Dong, Ling Ni, Fang Ye, Meng-Li Chen, Yu Feng, Yong-Qiang Deng, et al. Characterization of anti-viral immunity in recovered individuals infected by SARS-CoV-2. *medRxiv*. 2020.03.17.20036640. <https://doi.org/10.1101/2020.03.17.20036640>
18. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin J-B, Olsson A, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>
19. Hong-Yi Zheng, Mi Zhang, Cui-Xian Yang, Nian Zhang, Xi-Cheng Wang, Xin-Ping Yang, et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):541–3. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0401-3>
20. Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. Presence of SARS-CoV-2 reactive T cells in COVID-19 patients and healthy donors. *medRxiv*. 2020.04.17.20061440. <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.20061440>
21. Shomuradova AS, Vagida MS, Sheetikov SA, Zornikova KV, Kiryukhin D, Titov A, et al. SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T-cell receptors. *medRxiv*. 2020.05.20.20107813. <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.20107813>
22. Pia L. SARS-CoV-2-reactive T cells in patients and healthy donors. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):353. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0333-2>
23. Gaunt ER, Hardie A, Claas EC, Simmonds P, Templeton KE. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2940–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00636-10>
24. Callow KA, Parry HF, Sergeant M, Tyrrell DA. The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. *Epidemiol Infect*. 1990;105(2):435–46. <https://doi.org/10.1017/s0950268800048019>
25. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*. 2020;181(7):1489–501.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
26. Peeples L. News feature: avoiding pitfalls in the pursuit of a COVID-19 vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(15):8218–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005456117>
27. Gallais F, Velay A, Wendling M-J, Nazon C, Partisani M, Sibilia J, et al. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 induces cellular immune response without seroconversion. *medRxiv*. 2020.06.21.20132449. <https://doi.org/10.1101/2020.06.21.20132449>
28. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NMA, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol*. 2020;5(48):eabd2071. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd2071>
29. Yan-Ying Fan, Zi-Tong Huang, Li Li, Man-Hui Wu, Tao Yu, Richard A Koup, et al. Characterization of SARS-CoV-specific memory T cells from recovered individuals 4 years after infection. *Arch Virol*. 2009;154(7):1093–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0409-6>
30. Greenbaum JA, Kotturi MF, Kim Y, Oseroff C, Vaughan K, Salimi N, et al. Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(48):20365–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911580106>
31. Sridhar S, Begom S, Bermingham A, Hoschler K, Adamson W, Carman W, et al. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nat Med*. 2013;19(10):1305–12. <https://doi.org/10.1038/nm.3350>
32. Wilkinson TM, Li CKF, Chui CSC, Huang AKY, Perkins M, Lieberman JC, et al. Preexisting influenza-specific CD4⁺ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nat Med*. 2012;18(2):274–80. <https://doi.org/10.1038/nm.2612>
33. Hancock K, Veguilla V, Xiuhua Lu, Zhong W, Butler EN, Hong Sun, et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med*. 2009;361(20):1945–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0906453>
34. Gostic KM, Ambrose M, Worobey M, Lloyd-Smith JO. Potent protection against H5N1 and H7N9 influenza via childhood hemagglutinin imprinting. *Science*. 2016;354(6313):722–6. <https://doi.org/10.1126/science.aag1322>
35. Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, Grad YH, Lipsitch M. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. *Science*. 2020;368(6493):860–8. <https://doi.org/10.1126/science.abb5793>
36. Chuan Qin, Luoqi Zhou, Ziwei Hu, Shuoqi Zhang, Sheng Yang, Yu Tao, et al. Dysregulation of immune response in patients with Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):762–8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248>
37. Yufang Shi, Ying Wang, Changshun Shao, Jianan Huang, Jianhe Gan, Xiaoping Huang, et al. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death Differ*. 2020;27(5):1451–4. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0530-3>
38. Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, Yang B, Katselnick LC, Rattigan SM, et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: antibody kinetics, correlates of protection, and association of antibody responses with severity of disease. *medRxiv*. 2020.04.14.20065771. <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20065771>

39. Fan Wu, Aojie Wang, Mei Liu, Qimin Wang, Jun Chen, Shuai Xia, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *medRxiv*. 2020.03.30.20047365. <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>
40. Thevarajan I, Thi H O Nguyen, Koutsakos M, Druce J, Caly L, van de Sandt CE, et al. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(4):453–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0819-2>
41. Bauer T, Jilg W. Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. *Vaccine*. 2006;24(5):572–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.058>
42. Melgaco JG, Morgado LN, Santiago MA, de Oliveira JM, Lewis-Ximenez LL, Hasselmann B, et al. A single dose of inactivated hepatitis A vaccine promotes HAV-specific memory cellular response similar to that induced by a natural infection. *Vaccine*. 2015;33(32):3813–20. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.099>
43. Melgaco JG, Azamor T, Ano Bom APD. Protective immunity after COVID-19 has been questioned: what can we do without SARS-CoV-2-IgG detection? *Cell Immunol*. 2020;353:104114. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104114>
44. Pizzolla A, Wakim LM. Memory T cell dynamics in the lung during influenza virus infection. *J Immunol*. 2019;202(2):374–81. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800979>

Об авторах / Authors

Потеряев Дмитрий Александрович, канд. биол. наук. *Dmitry A. Poteryaev*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2695-8869>

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф. *Ravil A. Khamitov*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

Ефимов Григорий Александрович, канд. биол. наук. *Grigory A. Efimov*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7129-6062>

Шустер Александр Михайлович, канд. биол. наук. *Aleksandr M. Shuster*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6980-7190>

Статья поступила 30.06.2020
После доработки 17.08.2020
Принята к печати 28.08.2020

Received 30 June 2020
Revised 17 August 2020
Accepted 28 August 2020

Сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий

М. А. Водякова, А. Р. Сайфутдинова, Е. В. Мельникова*, Ю. В. Олефир

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

Клеточная линия является одним из обязательных компонентов биомедицинского клеточного продукта (БМКП), в составе которого могут быть исключительно жизнеспособные клетки человека. Также клеточные линии (в том числе клетки животных, насекомых, бактерий) могут являться субстратом получения некоторых биологических лекарственных препаратов. Перечень показателей качества и методов контроля качества лекарственных средств в России регламентирован Государственной фармакопеей, содержащей лишь несколько общих фармакопейных статей для препаратов крови или требования к клеточным линиям как к субстратам получения биологических лекарственных препаратов (т. е. предназначена для клеток всех видов). В Российской Федерации в настоящее время отсутствует нормативный документ (аналог Государственной фармакопеи), определяющий требования и методики определения качества БМКП. Таким образом, одной из проблем оценки качества БМКП как при разработке, так и в ходе проведения экспертизы качества при государственной регистрации является отсутствие нормативного документа, определяющего требования к показателям и методикам оценки качества БМКП. Однако для оценки качества (как клеточных линий, так и неклеточных компонентов) могут быть использованы некоторые общие фармакопейные статьи фармакопеи России и других стран. Цель работы — изучение и сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий, входящих в состав препаратов на основе клеток и тканей человека (аналогов БМКП), которые могут быть использованы в ходе экспертизы качества БМКП. В статье рассмотрены общие фармакопейные статьи (ОФС) фармакопей США, Европейского союза (ЕС), Японии и Республики Беларусь, включая ОФС для биологических/биотехнологических лекарственных препаратов, поскольку их общие требования распространяются и на клеточные линии человека, входящие в состав аналогов БМКП. Рассмотренные подходы и методы оценки качества препаратов на основе клеток и тканей, содержащиеся в ОФС фармакопей США и ЕС, могут служить основой для разработки ОФС в России, например для определения подлинности, активности, вирусной безопасности и микоплазм в клеточных линиях БМКП методами, основанными на амплификации нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: клеточная линия; биомедицинский клеточный продукт; экспертиза качества; Государственная фармакопея Российской Федерации; общая фармакопейная статья; показатели качества; методы контроля качества

Для цитирования: Водякова МА, Сайфутдинова АР, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(3):159–173. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-159-173>

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

Comparison of the World Pharmacopoeias' Requirements for the Quality of Cell Lines

M. A. Vodyakova, A. R. Sayfutdinova, E. V. Melnikova*, Yu. V. Olefir

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

The cell line is one of the necessary components of a biomedical cell product (BMCP) which can include only viable human cells. In addition, human, animal, insect, or bacterial cell lines can be used as a substrate for the production of some biological drugs. The list of quality parameters and test methods for medicinal products quality control are specified in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, but it contains only a few general monographs on blood products and a few requirements for cell lines as substrates for the production of biological drugs (which cover all types of cells). Currently, there is no regulatory document comparable to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation that would contain requirements and test methods for BMCP quality control in the Russian Federation. Thus, one of the issues that arises both during quality control and approval of BMCPs is the lack of a regulatory document defining requirements for BMCP quality parameters and test methods. However, some general monographs of the Russian Pharmacopoeia and other pharmacopoeias can be used for quality control of both cell lines and non-cellular components. The aim of the study was to analyse and compare different pharmacopoeial requirements for the quality of cell lines used as components in human cell- and tissue-based products (comparable to BMCPs), which could be used in BMCP quality control. The paper analyses general monographs of the United States Pharmacopoeia (USP), European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), Japanese Pharmacopoeia, Pharmacopoeia of the Republic of Belarus, including general monographs on biological/biotechnological products, because their requirements apply to human cell lines included as

components in products similar to BMCPs. The analysed approaches and methods of quality control of cell- and tissue-based products described in the USP and Ph. Eur. could form the basis for elaboration of general monographs for the Russian Pharmacopoeia, including identification, potency, viral safety, and mycoplasma tests that are based on the nucleic acid amplification technology and other tests for cell lines as components of BMCPs.

Key words: cell line; biomedical cell product; quality control; Russian State Pharmacopoeia; general monograph; quality parameters; quality control methods

For citation: Vodyakova MA, Sayfutdinova AR, Melnikova EV, Olefir YuV. Comparison of the world pharmacopoeias' requirements for the quality of cell lines. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(3):159–173. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-159-173>

Corresponding author: Ekaterina V. Melnikova; melnikovae@expmed.ru

Одним из критических этапов биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) согласно Федеральному закону № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» (180-ФЗ)¹ является экспертиза качества. Правила ее проведения описаны в приказах Минздрава России № 30н² и № 195н³ (для БМКП со сроком хранения/применения менее 15 суток). Показатели качества, по которым будет проводиться экспертиза качества БМКП, определены в приказе Минздрава России № 14н⁴.

В России перечень показателей и проведение методов контроля качества регламентированы Государственной фармакопеей XIV издания (ГФ РФ XIV)⁵, которая включает общие фармакопейные статьи (ОФС) и частные фармакопейные статьи (ФС), согласно Федеральному закону № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (61-ФЗ)⁶ предназначенные только для лекарственных средств (ЛС).

В Российской Федерации в настоящее время отсутствует нормативный документ (аналог ГФ РФ XIV), определяющий требования и методики оценки качества БМКП (аналогов ОФС, ФС), в соответствии с которым должна осуществляться экспертиза качества. Учитывая, что БМКП может состоять из нескольких компонентов, одним из которых обязательно будет являться клеточная линия (КЛ) человека, некоторые ОФС ГФ РФ XIV могут быть использованы для оценки качества КЛ, входящих в БМКП. Кроме того, не запрещено следовать рекомендациям фармакопей Европейского союза (ЕС)⁷, США⁸ и других фармакопей, касающихся оценки качества препаратов на основе клеток и тканей человека (аналогов БМКП). Также разработчиками (заявителями) могут быть предложены с соответствующим обоснованием другие методы и методики контроля качества при наличии их валидации.

Цель работы — изучение и сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий, входящих в состав препаратов на основе клеток и тканей человека (аналогов БМКП), которые могут быть использованы в ходе экспертизы качества БМКП.

В рамках поставленной цели были рассмотрены ОФС из различных зарубежных фармакопей, которые могут быть использованы для оценки качества КЛ, включая ОФС для биоло-

гических/биотехнологических продуктов, поскольку их общие требования к КЛ распространяются и на КЛ человека, входящие в состав препаратов на основе клеток и тканей человека (аналогов БМКП).

Для сравнения требований к качеству КЛ были проанализированы тексты пяти фармакопей:

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV);
2. Фармакопея США 42—Национальный формуляр 37 (ФСША 42-НФ 37) (the United States Pharmacopeia 42 and the National Formulary 37, USP 42-NF 37);
3. Европейская фармакопея 10 издания (ЕФ 10.0) (European Pharmacopoeia 10th ed., Ph. Eur. 10.0);
4. Государственная фармакопея Республики Беларусь II издания (ГФ РБ II)⁹;
5. Фармакопея Японии XVII издания (ЯФ XVII) (The Japanese Pharmacopoeia XVII, JP 17)¹⁰.

Все ОФС, относящиеся к работе с КЛ, были сгруппированы по показателям, которые могут применяться при экспертизе качества БМКП (табл. 1).

В законодательстве США, стран ЕС, РБ и Японии препараты для генной терапии (как *in vivo*, так и *ex vivo*) определяются как биологические лекарственные препараты. В законодательстве Российской Федерации препараты для генной терапии *in vivo* и *ex vivo* регулируются разными Федеральными законами. Первые, согласно Федеральному закону № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности»¹¹, называются генотерапевтическими и относятся к биологическим (их обращение на территории России регулируется 61-ФЗ), а вторые — к БМКП (180-ФЗ). Таким образом, в рассмотрение были включены ОФС, содержащие требования зарубежных фармакопей к препаратам генной терапии и к КЛ, входящим в их состав (в случае генной терапии *ex vivo*).

Также следует отметить, что некоторые ОФС фармакопей США, ЕС и Японии гармонизированы, а фармакопея РБ полностью разработана на основе Европейской фармакопей с предоставленного разрешения Европейского директората по контролю качества лекарственных средств и здравоохранению Совета

¹ Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

² Приказ Минздрава России от 31.01.2017 № 30н «Об утверждении Правил проведения биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов и форм заключений комиссии экспертов федерального государственного бюджетного учреждения по проведению биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов».

³ Приказ Минздрава России от 28.04.2017 № 195н «Об утверждении Порядка проведения экспертизы качества биомедицинского клеточного продукта в месте производства биомедицинского клеточного продукта с использованием оборудования производителя».

⁴ Приказ Минздрава России от 19.01.2017 № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт».

⁵ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

⁶ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

⁷ European Pharmacopoeia 10th ed.; 2020.

⁸ USP 42–NF 37; 2019.

⁹ Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд.; 2012.

¹⁰ Japanese Pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

¹¹ Федеральный закон Российской Федерации от 05.07.1996 № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности».

Таблица 1. Сравнительный перечень общих фармакопейных статей
Table 1. Comparative list of general monographs

Показатель качества Quality parameter	Общие фармакопейные статьи различных фармакопей General monographs included in different pharmacopoeias			
	ГФ РФ XIV Ph. Rus. 14	ФСША 42-НФ 37 USP 42-NF 37	ЕФ 10.0 Ph. Eur. 10.0	ГФ РБ II Ph. Bel. 2
Общие требования к качеству, терминология General quality requirements, terminology	ОФС 1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам — субстратам производства биологических лекарственных препаратов OFS 1.7.2.0011.15 Requirements for cell cultures used as substrates for the production of biological products	<1046> Cellular and Tissue-Based Products <1047> Gene Therapy Products	5.2.1 Terminology used in monographs on biological products 5.2.3 Cell substrates for the production of vaccines for human use 5.1.4 Gene transfer medicinal products for human use	5.2.1 Общепринятая терминология в статьях на биологические продукты 5.2.3 Клетки-продуценты для производства вакцин для медицинского применения 5.1.4 Лекарственные средства для генной терапии для медицинского применения 5.2.1 Terminology used in monographs on biological products 5.2.3 Cells for the production of vaccines for human use 5.1.4 Gene transfer medicinal products for human use
Стерильность Sterility	ОФС 1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота ОФС 1.2.4.0003.15 Стерильность Проект ОФС Микробиологический контроль биомедицинских клеточных продуктов OFS 1.2.4.0002.18 Microbiological quality OFS 1.2.4.0003.15 Sterility Draft monograph Microbiological control of biomedical cell products	61 Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests 62 Microbiological Examination of Nonsterile Products: Tests for Specified Microorganisms 71 Sterility Tests <1071> Rapid Microbial Tests for Release of Sterile Short-Life Products: a Risk-Based Approach	2.6.1 Sterility 2.6.12 Microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration tests 2.6.13 Microbiological examination of nonsterile products: tests for specified microorganisms 2.6.27 Microbiological examination of cell-based preparations 5.1.6 Alternative methods for control of microbiological quality	2.6.1 Стерильность 2.6.12 Микробиологические испытания нестерильной продукции: суммарное количество жизнеспособных аэробов 2.6.13 Микробиологические испытания нестерильной продукции: испытания на наличие специфических микроорганизмов 2.6.27 Микробиологический контроль клеточных продуктов 5.1.6 Альтернативные методы контроля микробиологической чистоты 2.6.1 Sterility 2.6.12 Microbiological examination of nonsterile products: total viable count 2.6.13 Microbiological examination of nonsterile products: tests for specified microorganisms 2.6.27 Microbiological examination of cell-based preparations 5.1.6 Alternative methods for control of microbiological quality
Микоплазмы Mycoplasmas	ОФС 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм OFS 1.7.2.0031.15 Mycoplasma Tests	63 Mycoplasma Tests	2.6.7 Mycoplasmas	2.6.7 Микоплазма 2.6.7 Mycoplasmas
				G3 Mycoplasma Testing for Cell Substrates used for the Production of Biotechnological/Biological Products

Продолжение табл. 1
Table 1 (continued)

Общие фармакопейные статьи различных фармакопей General monographs included in different pharmacopoeias					
Показатель качества Quality parameter	ГФ РФ XIV Ph. Rus. 14	ФСША 42-НФ 37 USP 42-NF 37	ЕФ 10.0 Ph. Eur. 10.0	ГФ РБ II Ph. Bel. 2	ЯФ XVII JP 17
Бактериальные эндотоксины Bacterial Endotoxins	ОФС 1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины OFS 1.2.4.0006.15 Bacterial Endotoxins	85 Bacterial Endotoxins Test	2.6.14 Bacterial Endotoxins	2.6.14 Бактериальные эндотоксины 2.6.14 Bacterial Endotoxins	4.01 Bacterial Endotoxins Test G4 Decision of Limit for Bacterial Endotoxins
	ОФС 1.1.0024.18 Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств ОФС 1.2.4.0005.15 Пирогенность ОФС 1.2.4.0015.18 Вирусная безопасность ОФС 1.7.2.0013.15 Полимеразная цепная реакция ОФС 1.7.2.0022.15 Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот ОФС 1.7.2.0033.15 Метод иммуноферментного анализа Проект ОФС Определения остаточной ДНК ОФС 1.1.0024.18 Minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via medicinal products ОФС 1.2.4.0005.15 Pyrogenicity ОФС 1.2.4.0015.18 Viral safety ОФС 1.7.2.0013.15 Polymerase chain reaction ОФС 1.7.2.0022.15 Identification and control of purity of biological products by Western blotting ОФС 1.7.2.0033.15 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Draft monograph Determination of residual DNA	151 Pyrogen Test <1043> Ancillary Materials for Cell, Gene, and Tissue-Engineered Products <1044> Cryopreservation of Cells <1050> Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin <1102> Immunological Test Methods—General Considerations <1103> Immunological Test Methods—Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) <1104> Immunological Test Methods—Immunoblot Analysis <1125> Nucleic Acid-Based Techniques—General <1126> Nucleic Acid-Based Techniques—Extraction, Detection, and Sequencing <1127> Nucleic Acid-Based Techniques—Amplification <1128> Nucleic Acid-Based Techniques—Microarray <1129> Nucleic Acid-Based Techniques—Genotyping <1130> Nucleic Acid-Based Techniques—Approaches for Detecting Trace Nucleic Acids (Residual DNA Testing) <1237> Virology Test Methods	2.6.8 Pyrogens 2.6.21 Nucleic acid amplification techniques 2.7.1 Immunochemical methods 5.1.7 Viral safety 5.2.8 Minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products 5.2.12 Raw materials of biological origin for the production of cell-based and gene therapy medicinal products	2.6.8 Пирогенность 2.6.21 Методы амплификации нуклеиновых кислот 2.7.1 Иммунохимические методы 5.1.7 Вирусная безопасность 5.2.8 Снижение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении медицинских лекарственных средств 2.6.8 Pyrogens 2.6.21 Nucleic acid amplification techniques 2.7.1 Immunochemical methods 5.1.7. Viral safety 5.2.8 Minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human medicinal products	4.04 Pyrogen Test G3 Basic Requirements for Viral Safety of Biotechnological/Biological Products listed in Japanese Pharmacopoeia G3 Qualification of Animals as Origin of Animal-derived Medicinal Products provided in the General Notices of Japanese Pharmacopoeia and Other Standards G3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Продолжение табл. 1
Table 1 (continued)

Показатель качества Quality parameter	Общие фармакопейные статьи различных фармакопей General monographs included in different pharmacopoeias			
	ГФ РФ XIV Ph. Rus. 14	ФСША 42-НФ 37 USP 42-NF 37	ЕФ 10.0 Ph. Eur. 10.0	ГФ РБ II Ph. Bel. 2
Подлинность, активность Identification, potency	ОФС 1.7.2.0013.15 Полимеразная цепная реакция ОФС 1.7.2.0022.15 Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот ОФС 1.7.2.0033.15 Метод иммуноферментного анализа Проект ОФС Протоочная цитометрия ОФС 1.7.2.0013.15 Polymerase chain reaction ОФС 1.7.2.0022.15 Identification and control of biological products purity by Western blotting ОФС 1.7.2.0033.15 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Draft OFS Flow cytometry	<1027> Flow Cytometry <1102> Immunological Test Methods—General Considerations <1103> Immunological Test Methods—Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) <1104> Immunological Test Methods—Immunoblot Analysis <1125> Nucleic Acid-Based Techniques—General <1126> Nucleic Acid-Based Techniques—Extraction, Detection, and Sequencing <1127> Nucleic Acid-Based Techniques—Amplification <1128> Nucleic Acid-Based Techniques—Microarray <1129> Nucleic Acid-Based Techniques—Genotyping	2.6.21 Nucleic acid amplification techniques 2.7.1 Immunochemical methods 2.7.24 Flow cytometry	2.6.21 Методы амплификации нуклеиновых кислот 2.7.1 Иммунохимические методы 2.7.24 Проточная цитометрия 2.6.21 Nucleic acid amplification techniques 2.7.1 Immunochemical methods 2.7.24 Flow cytometry
Жизнеспособность Viability	—	—	2.7.29 Nucleated cell count and viability	2.7.29 Определение количества и жизнеспособности ядросодержащих клеток 2.7.29 Nucleated cell count and viability
pH (если применимо) pH (if applicable)	ОФС 1.2.1.0004.15 Ионометрия OFS 1.2.1.0004.15 Ionometry	791 pH	2.2.36 Potentiometric determination of ionic concentration using ion-selective electrodes	2.2.36 Потенциометрическое определение концентрации ионов с использованием ионселективных электродов 2.2.36 Potentiometric determination of ionic concentration using ion-selective electrodes

Примечание. ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации, ФСША-НФ — фармакопея США-Национальный формуляр, ЕФ — Европейская фармакопея, ГФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь, ЯФ — фармакопея Японии. Номера общих фармакопейных статей, выделенные цветом, — гармонизированные тексты фармакопейных статей; курсивом выделены фармакопейные статьи, содержащие информацию, которая применима для различных показателей качества.

«—» общие фармакопейные статьи отсутствуют.
Note. Ph. Rus.—State Pharmacopoeia of the Russian Federation, USP-NF—United States Pharmacopoeia and National Formulary, Ph. Eur.—European Pharmacopoeia, Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus, JP—Japanese Pharmacopoeia. The numbers of harmonised general monographs are highlighted in colour; the monographs containing information that is applicable to various quality parameters are given in italics.
—no general monographs.

Европы (EDQM)¹², поэтому номера статей (монографий) у них совпадают, и в большинстве случаев тексты будут рассмотрены как один общий документ (ЕФ 10.0/ГФ РБ II).

Для удобства пользователей в фармакопее США выделяется отдельная глава, в которой перечислены все статьи, которые могут быть использованы для оценки качества препаратов на основе клеток, генов и тканей, — это глава 8¹³.

Общие требования к качеству клеточных линий, терминология

Были рассмотрены ОФС с общими требованиями всех фармакопей. ОФС содержат следующие требования.

1. Источник, история и характеристика клеточных линий.

Для КЛ человека описывают использованные ткань или орган и пригодность донора, которая включает получение данных истории болезни, физическую оценку донора и результаты скрининга на инфекционные заболевания. В ФСША 42-НФ 37, в отличие от остальных фармакопей, выделены отдельно три источника клеток: аутологичный, аллогенный и ксеногенный.

Все КЛ должны быть получены в условиях, которые обеспечивают высокую степень асептики.

2. Характеристика главного и рабочего банков клеток.

Согласно ФСША 42-НФ 37 «банк клеток представляет собой коллекцию клеток, полученных из объединенных клеток или полученных из одной клетки клона или донорской ткани...». Система банков клеток обычно состоит из главного и рабочего банков. Задача такой системы заключается в поддержании генотипической и фенотипической стабильности, что дает возможность наработки и длительного хранения стандартизованного клеточного материала для производства. Характеристика банков клеток включает определенные показатели, представленные в таблице 2.

Следует отметить, что согласно всем фармакопеям без исключения требуется проверка КЛ на подлинность, стерильность, жизнеспособность и наличие контаминантов.

3. Качество используемых реактивов и вспомогательных веществ животного и человеческого происхождения.

Все используемые реактивы и вспомогательные вещества должны иметь сертификаты, подтверждающие качество.

4. Методы испытания КЛ (показатели качества).

В таблице 3 приведены показатели качества и методы испытания КЛ, содержащиеся в фармакопеях.

Можно отметить, что абсолютно во всех фармакопеях общими требованиями являются оценка подлинности и испытание на посторонние агенты. В фармакопеях РФ, ЕС и РБ большинство методов совпадают за исключением испытаний на онкогенность. В ФСША 42-НФ 37 описывается показатель «Активность» и «Анализ, определяющие дозу», которые отражают показатель «Жизнеспособность». Показатели качества, описанные в ФСША 42-НФ 37, близки к показателям качества для экспертизы качества БМКП в России. Отсутствие показателя «Активность» КЛ в ГФ РФ XIV объясняется тем, что ОФС (1.7.2.0011.15) предназначена для субстратов получения иммунобиологических лекарственных препаратов.

Исходя из описанных общих требований можно заметить, что структуры статей в фармакопеях РФ, ЕС и РБ схожи, так как они описывают первичные и перевиваемые клетки-продуценты

для производства вакцин, в отличие от ОФС ФСША 42-НФ 37, которые посвящены продуктам на основе клеток и тканей человека и имеют совершенно другой подход к оценке качества КЛ. Главное отличие заключается в том, что в ФСША 42-НФ 37 рассматриваются требования с точки зрения применения системы менеджмента качества и использования принципов управления рисками для качества и большое внимание уделяется управлению процессом. Риск-ориентированный подход применяется к качеству КЛ на протяжении всего жизненного цикла продукта.

1. До начала производства: оценка пригодности всех компонентов, включая КЛ.

2. В процессе производства: методы выделения и отбора клеток, культивирование и дифференцировка, разработка продукта. Контроль в процессе производства включает следующие параметры:

- количество клеток и жизнеспособность;
- микробиологический контроль (стерильность, эндотоксины, микоплазма);
- экспрессия фенотипических или генотипических маркеров;
- проверка морфологии по визуальным стандартам;
- производство желаемого биологически активного вещества;
- определение удвоения популяции, числа пассажей, возраста культуры;
- анализы на наличие технологических примесей;
- мониторинг параметров системы культивирования (содержание углекислого газа (CO₂), относительная влажность, pH, содержание глюкозы и т.д.);
- функциональные тесты, такие как анализ образования колоний на агаре (колониеобразующие единицы, КОЕ) и экспрессия специфических белков клеток;
- однородность содержания (с ноября 2020 г.)¹⁴;
- количественное определение твердых частиц (с ноября 2020 г.)¹⁵;
- визуальное определение клеточных агрегатов и других примесей (с ноября 2020 г.)¹⁶.

3. Контроль качества конечного продукта (КЛ, входящей в состав): показатели качества, представленные в таблице 3.

Таким образом, в отличие от фармакопей других стран, в ФСША 42-НФ 37 представлены требования к контролю в процессе производства, который гарантирует получение продукта необходимого качества и количества, а также способствует оценке влияния изменений/отклонений процесса.

Кроме того, в ФСША 42-НФ 37 предлагается использование референтного препарата, относительно которого производится внутрипроизводственный контроль. Референтный препарат должен подвергаться дополнительному тестированию и не должен храниться в той же концентрации (дозе), составе или температуре, что и конечный продукт. Его стабильность должна быть известна. В качестве примера в ОФС <1046> ФСША 42-НФ 37 приводится описание банка нормальных донорских клеток соответствующего типа для клеточного продукта с коротким сроком хранения или для аутологичного применения.

Стерильность

Стерильность. Стерильность — один из важнейших параметров при работе с КЛ, поскольку микробиологическая кон-

¹² Решение коллегии Евразийской экономической комиссии от 22.09.2015 № 119 «О концепции гармонизации фармакопей государств — членов Евразийского экономического союза».

¹³ Cell, gene, and tissue based products. USP 42-NF 37; 2019.

¹⁴ <1046> Cellular and Tissue-Based Products. USP 42-NF 37; 2019.

¹⁵ Там же.

¹⁶ Там же.

Таблица 2. Характеристика главного и рабочего банков клеток в разных фармакопеях
Table 2. Characterisation of master and working cell banks in different pharmacopoeias

Показатели, необходимые для характеристики банков клеток, согласно: Cell bank characterisation parameters		
ГФ РФ XIV ОФС 1.7.2.0011.15 Ph. Rus. 14 OFS 1.7.2.0011.15	ФСША 42-НФ 37 <1046> USP 42-NF 37 <1046>	ЕФ 10.0/ГФ РБ II 5.2.3 Ph. Eur. 10.0/Ph. Bel. 2 5.2.3
1. Наименование 2. Шифр КЛ 3. Происхождение КЛ 4. Запас клеток 5. Номер пассажа и дата закладки клеток на хранение 6. Условия криоконсервации, режим хранения и жизнеспособность после размораживания 7. Параметры культивирования 8. Подлинность 9. Стерильность (в том числе микоплазмы) 10. Вирусная безопасность 11. Морфология 12. Хромосомная стабильность 13. Туморогенность (если применимо) 14. Онкогенность (если применимо) 15. Стабильность биологических свойств (количество рекомендованных пассажей) 16. Сфера применения 1. Name 2. CL code 3. The origin of CL 4. Cell stock 5. Passage number and date of placing cells into storage 6. Cryopreservation conditions, storage conditions, and viability after thawing 7. Cultivation parameters 8. Identity 9. Sterility (including mycoplasmas) 10. Viral safety 11. Morphology 12. Chromosomal stability 13. Tumorigenicity (if applicable) 14. Oncogenicity (if applicable) 15. Stability of biological properties (number of recommended passages) 16. Scope	1. Подлинность 2. Стерильность (в том числе микоплазмы) 3. Вирусная безопасность 4. Кинетика роста и время удвоения популяции 5. Морфология 6. Процент слияния при пассировании 7. Количество клеток 8. Жизнеспособность (до и после криоконсервации) 9. Фенотипическая экспрессия желательных и нежелательных маркеров (до и после криоконсервации) 10. Мониторинг уникальных биохимических маркеров (до и после криоконсервации) 11. Оценка функциональной активности (до и после криоконсервации) 12. Анализ экспрессии генов и белков (до и после криоконсервации) 13. Экспрессия иммунных антигенов гистосовместимости (HLA/MHC) 14. Молекулярная аутентификация 15. Хромосомная стабильность 1. Identity 2. Sterility (including mycoplasmas) 3. Viral safety 4. Growth kinetics and population doubling time 5. Morphology 6. Percent confluence at passage 7. Cell counts 8. Viability (pre- and postcryopreservation) 9. Phenotypic expression of desired and undesired cell types (pre- and postcryopreservation) 10. Monitoring of unique biochemical markers (pre- and postcryopreservation) 11. Assessments of functional activity (pre- and postcryopreservation) 12. Gene and protein expression analysis (pre- and postcryopreservation) 13. Expression of immune histocompatibility antigens (HLA/MHC) 14. Molecular fingerprinting 15. Chromosomal stability	1. Подлинность 2. Стерильность (в том числе микоплазмы) 3. Вирусная безопасность 4. Кинетика роста и время удвоения популяции 5. Морфология 6. Кариотип 7. Стабильность биологических свойств (количество рекомендованных пассажей) 8. Хромосомная стабильность 1. Identity 2. Sterility (including mycoplasmas) 3. Viral safety 4. Growth kinetics and population doubling time 5. Morphology 6. Karyotype 7. Stability of biological properties (number of recommended passages) 8. Chromosomal stability

Примечание. ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации, ФСША-НФ — фармакопея США—Национальный формуляр, ЕФ — Европейская фармакопея, ГФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь, КЛ — клеточная линия.

Note. Ph. Rus.—State Pharmacopoeia of the Russian Federation, USP-NF—United States Pharmacopoeia and National Formulary, Ph. Eur.—European Pharmacopoeia, Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus, CL—cell line.

таминация может привести к их гибели или тяжелым последствиям при применении у пациентов.

Основным отличием в рассматриваемых фармакопеях является информация об используемых средах для культивирования. В ФСША 42-НФ 37, ЕФ 10.0 и ЯФ XVII представлены только тиогликолевая среда и среда на основе гидролизатов соевых бобов и казеина. Однако в фармакопеях Республики Беларусь и Российской Федерации также содержится информация о среде Сабуро, которая подходит для выявления как грибов, так и аэробных бактерий.

В ФСША 42-НФ 37, в отличие от ЕФ 10.0 и ЯФ XVII, присутствует информация о модификации сред для инактивации содержащегося в образце пенициллина или цефалоспорины. Подобные действия необходимы, поскольку наличие антибактериальных веществ может маскировать контаминацию. В ФСША 42-НФ 37 уточняется возможность использования альтернативных микроорганизмов для испытаний питательных

сред, более подробно изложено о разбавителях и вспомогательных жидкостях для мембранной фильтрации (аналогичный раздел существует в ГФ РФ XIV).

В ГФ РФ XIV имеются некоторые отличия, а именно представлена подробная информация о различных способах устранения антимикробного действия препарата в образце и содержится указание о значениях температуры и продолжительности процесса, которые необходимы для стерилизации питательных сред (в других фармакопеях указывается только на сам факт необходимости стерилизации).

В ЕФ 10.0, ФСША 42-НФ 37, ЯФ XVII, ГФ РБ II в сравнении с ГФ РФ XIV по-разному описываются испытания на стерильность для испытуемых образцов методом мембранной фильтрации (дозировка, pH).

Микробиологическая чистота. Необходимость проведения испытаний на микробиологическую чистоту (МБЧ) при работе с КЛ обусловлена тем, что микроорганизмы-конта-

Таблица 3. Показатели качества и методы испытания клеточных линий согласно разным фармакопеям
Table 3. Cell line quality characteristics and respective test methods according to different pharmacopoeias

Показатели качества клеточных линий согласно: Cell line quality characteristics		
ГФ РФ XIV ОФС 1.7.2.0011.15 Ph. Rus. 14 OFS 1.7.2.0011.15	ФСША 42-НФ 37 <1046> USP 42-NF 37 <1046>	ЕФ 10.0/ГФ РБ II 5.2.3 Ph. Eur. 10.0/Ph. Bel. 2 5.2.3
1. Морфология - микроскопия 2. Подлинность - электрофорез - кариологический анализ хромосом (методы дифференциального окрашивания (C, G, Q и R)) - молекулярно-генетические методы (полимеразная цепная реакция, секвенирование) - иммунологические методы (реакция гемагглютинации, метод смешанной агглютинации и др.) 3. Оценка туморогенности <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> - метод инвазивности в органы культуры - испытания на иммуносупрессивных или имеющих генетическую иммунную недостаточность животных 4. Оценка онкогенности <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> - субкультивирование клеток - испытания на иммуносупрессивных или имеющих генетическую иммунную недостаточность животных 5. Испытание на присутствие посторонних агентов стерильность - методы мембранной фильтрации и прямого посева микоплазма - культуральный и цитохимический методы - полимеразная цепная реакция эндогенные ретровирусы - полимеразная цепная реакция - методы иммунофлуоресценции или иммуноферментный анализ - электронная микроскопия 1. Morphology - microscopy 2. Identity - electrophoresis - karyotype analysis of chromosomes (differential staining methods (C, G, Q and R)) - molecular genetic methods (polymerase chain reaction, sequencing) - immunological methods (hemagglutination assay, mixed-antigen agglutination method, etc.) 3. Assessment of tumorigenicity <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> - organ culture assay for invasiveness - tests in immunosuppressed/immunodeficient animals 4. Assessment of oncogenicity <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> - cell subculturing - tests in immunosuppressed/immunodeficient animals 5. Test for the presence of extraneous agents sterility - membrane filtration and direct inoculation methods mycoplasma - culture and indicator cell culture methods - polymerase chain reaction endogenous retroviruses - polymerase chain reaction - immunofluorescence methods or enzyme-linked immunosorbent assay - electron microscopy	1. Подлинность - проточная цитометрия - иммуноферментный анализ - фингерпринтинг (метод «отпечатков пальцев») 2. Стерильность - методы мембранной фильтрации и прямой инокуляции - окраска по Граму - полимеразная цепная реакция 3. Микоплазма - культуральный и цитохимический методы - полимеразная цепная реакция - иммуноферментный анализ 4. Бактериальные экзотоксины - геле-тромб тест - турбидиметрический метод - хромогенный метод 5. Активность - подсчет жизнеспособных клеток - анализ образования колоний - проточная цитометрия - испытания на животных моделях 6. Анализы, определяющие дозу (жизнеспособность) - подсчет с помощью окрашивания трипановым синим - анализ FACS или проточная цитометрия - подсчет с помощью гематометра - подсчет с помощью счетчика клеток 1. Identity - flow cytometry - enzyme-linked immunosorbent assay - nucleic acid fingerprinting 2. Sterility - membrane filtration and direct inoculation methods - Gram staining - polymerase chain reaction 3. Mycoplasma - culture and indicator cell culture methods - polymerase chain reaction - enzyme-linked immunosorbent assay 4. Bacterial Endotoxins - gel-clot method - turbidimetric method - chromogenic method 5. Potency - viable cell number - colony-formation assay - flow cytometry - animal models tests 6. Dose-defining assays (viability) - counting by trypan blue staining - by FACS analysis or flow cytometry - counting by hemacytometer - counting by cell counter	1. Морфология - микроскопия 2. Подлинность - фингерпринтинг (метод «отпечатков пальцев») - иммуноферментный анализ - проточная цитометрия - полимеразная цепная реакция (только в ЕФ 10.0) 3. Оценка туморогенности (канцерогенности в ГФ РБ) <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> - метод инвазивности в органы культуры - испытания на иммуносупрессивных или имеющих генетическую иммунную недостаточность животных 4. Испытание на присутствии посторонних агентов стерильность - методы мембранной фильтрации и прямой инокуляции микоплазма - культуральный и цитохимический методы - полимеразная цепная реакция эндогенные ретровирусы - полимеразная цепная реакция 1. Morphology - microscopy 2. Identity - nucleic acid fingerprinting - enzyme-linked immunosorbent assay - flow cytometry - polymerase chain reaction (only in Ph. Eur.) 3. Assessment of tumorigenicity (carcinogenicity in Ph. Bel.) <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> - organ culture assay for invasiveness - tests in immunosuppressed/immunodeficient animals 4. Test for the presence of extraneous agents sterility - membrane filtration and direct inoculation methods mycoplasma - culture and indicator cell culture methods - polymerase chain reaction endogenous retroviruses - polymerase chain reaction

Примечание. ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации, ФСША-НФ — фармакопея США—Национальный формуляр, ЕФ — Европейская фармакопея, ГФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь.

Note. Ph. Rus.—State Pharmacopoeia of the Russian Federation, USP-NF—United States Pharmacopoeia and National Formulary, Ph. Eur.—European Pharmacopoeia, Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus.

минанты могут воздействовать на терапевтическую активность продукта (биodeградация), а также могут быть причиной развития некоторых инфекционных заболеваний. Не выявленные вовремя микроорганизмы могут стать причиной возникновения новых штаммов антибиотикорезистентных микроорганизмов.

В ФСША 42-НФ 37, ЕФ 10.0 и ГФ РБ II ОФС по оценке МБЧ разделены на две части. Первая часть посвящена определению общего количества жизнеспособных аэробов, вторая — испытаниям на наличие специфических микроорганизмов. Отмечено, что ОФС, посвященные МБЧ, в ГФ РФ XIV и ЯФ XVII имеют единую структуру.

Во всех фармакопеях указано, что испытания на МБЧ должны проводиться в асептических условиях, с использованием методов, описанных в ОФС, которые включают в себя правила по подготовке образца к анализу, отбору образцов для анализа, количественному определению микроорганизмов и, в некоторых случаях, их идентификации, а также требования к приготовлению питательных сред, необходимых для проведения испытаний на МБЧ.

В ГФ РФ XIV изложена информация о предназначении методов определения МБЧ для нестерильных и биологических ЛС, а во всех остальных фармакопеях указано, что эти методы не применимы к продуктам, содержащим жизнеспособные микроорганизмы в качестве активных ингредиентов. Только в ГФ РФ XIV приводится подробное описание, какое количество микроорганизмов допустимо для каждой лекарственной формы.

Во всех фармакопеях указаны эталонные тест-штаммы для проведения испытаний на МБЧ: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Aspergillus brasiliensis*. При этом в ГФ РФ XIV помимо вышеперечисленных штаммов представлены *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* и *Staphylococcus epidermidis*. Также во всех фармакопеях описана необходимость определения наличия антимикробного действия исследуемого образца. В ГФ РФ XIV представлены следующие методы определения: определение антимикробного действия в условиях испытаний на МБЧ и метод репликаций. ФСША 42-НФ 37, ЯФ XVII, ГФ РБ II, ЕФ 10.0 лишь указывают на то, что у образца «должно быть приемлемым определение микробной контаминации». Если этому определению мешает антимикробное действие образца, следует разработать методику для его устранения. В качестве устранения антимикробного действия все фармакопеи предлагают: увеличение объема разбавителя или питательной среды, включение нейтрализующего агента, мембранную фильтрацию или комбинацию этих способов.

В фармакопеях представлены следующие методы количественного определения микроорганизмов: чашечные агаровые методы (глубинный метод, двухслойный метод и др.), метод мембранной фильтрации, метод наиболее вероятных чисел.

В качестве тест-штаммов микроорганизмов в ГФ РФ XIV указаны энтеробактерии, устойчивые к желчи, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*. В остальных фармакопеях, в дополнение к перечисленным выше микроорганизмам, предложен *Clostridium sporogenes*.

Только в ГФ РФ XIV регламентированы биохимические тесты для идентификации микроорганизмов. К ним относятся тесты на выявление фермента цитохромоксидазы (оксидазный тест), индола, коагулазы.

Во всех фармакопеях подробно описан состав сред и особенности их изготовления, но только в ГФ РФ XIV представ-

лены такие разделы, как: оценка качества питательных сред, ростовых свойств, определение селективных и диагностических свойств питательных сред, стерильность и хранение питательных сред.

На основании рассмотренных показателей можно сделать вывод, что статья ГФ РФ XIV о МБЧ охватывает максимальное количество показателей МБЧ среди аналогичных статей сравняемых фармакопей.

Альтернативные методы контроля микробиологической чистоты. Альтернативные методы контроля МБЧ КЛ представлены в качестве справочной информации в виде отдельной ОФС во всех фармакопеях кроме ГФ РФ XIV и могут быть использованы как альтернативные методы контроля в случаях, когда основные методы не выполнимы и/или недостаточны. Все методы подразделяются на методы прямого и косвенного выявления микроорганизмов (табл. 4).

В ЕФ 10.0 и ГФ РБ II предлагается самый большой выбор методов, при этом в данных ОФС помимо разделения на прямые и косвенные методы приведена отличная от других категоризация на подгруппы (основанные на росте микроорганизмов, анализе клеточных компонентов и др.).

В ФСША 42-НФ 37 иначе представлен подход к применению альтернативных методов для подтверждения стерильности продуктов. Ее содержание основано в первую очередь на оценке риска методов, отличных от тех, что описаны в ОФС Стерильность.

В ГФ РФ XIV в настоящее время отсутствует упоминание об альтернативных методах определения МБЧ КЛ.

Микробиологический контроль клеточных продуктов. В ЕФ 10.0 и ГФ РБ II представлены статьи о микробиологическом контроле клеточных продуктов, в России разрабатывается проект ОФС о микробиологическом контроле БМКП.

В ГФ РБ II отмечено, что при работе с КЛ предпочтительнее использовать данную ОФС вместо статьи о стерильности, поскольку методы, описанные в статье о микробиологическом контроле клеточных продуктов, обладают большей чувствительностью, более широким диапазоном применения и проводятся в более короткие сроки.

В статьях ГФ РБ II и ЕФ 10.0, а также в проекте ОФС ГФ РФ указан перечень микроорганизмов, используемых в качестве стандартов при испытаниях ростовых свойств, описаны правила отбора образцов для испытаний, указаны правила хранения образцов, необходимость нейтрализации антимикробного действия.

Во всех фармакопеях в качестве испытания рассматривается метод культурального посева, но в ЕФ 10.0 и ГФ РБ II отмечено, что данное испытание следует проводить не менее чем на 2 подходящих средах. В ЕФ 10.0 предлагается два температурных диапазона для более точного выявления контаминантов при последующей инкубации. Также в ЕФ 10.0 указывается на необходимость проверки пригодности системы на специфичность (отсутствие ложноположительного результата), чувствительность, воспроизводимость и надежность.

В ЕФ 10.0, учитывая небольшой срок годности некоторых клеточных продуктов (от нескольких суток), уточняется, что в некоторых случаях испытания на МБЧ не могут быть проведены до момента введения продукта пациенту. Также в ЕФ 10.0 указано, что для анализа на МБЧ должен быть использован не только супернатант, но и сами клетки. Проект ОФС ГФ РФ допускает использование пациентом БМКП до окончательной экспертизы продукта при условии отсутствия контаминантов при окраске по Граму.

Использование описанных выше альтернативных методик возможно при условии их валидации.

Микоплазма

Тестирование на микоплазму является необходимым требованием контроля качества КЛ.

Среди всех представленных фармакопей только в ФСША 42-НФ 37 приводится описание микоплазм, отмечается, что их нельзя выявить при помощи окраски по Граму, и объясняются причины опасности микоплазменной контаминации.

Во всех фармакопеях указана необходимость проведения работы с КЛ в асептических условиях.

В описании культурального метода в тексте ЕФ 10.0 и ГФ РБ II предлагается использовать по крайней мере один штамм из тест-штаммов, в ЯФ XVII и ФСША 42-НФ 37 — по меньшей мере два известных вида или штамма. В ГФ РФ XIV предлагается использовать один конкретный стандартный образец *Mycoplasma arginini* G 230, но допускается использование других в необходимом количестве.

В качестве питательных сред в ГФ РФ XIV рекомендуется использовать среды Каган полужидкую (для накопления микоплазм) и плотную (для подтверждения наличия микоплазм), а также представлены две схемы культивирования: с инкубированием в течение 14 сут и с предварительным инкубированием на 5–7 сут и дальнейшим инкубированием в течение 14 сут. В ГФ РБ II, ЕФ 10.0, ФСША 42-НФ 37 описаны следующие питательные жидкие и твердые среды: Хейфлика (для общего определения микоплазм), Фрея (рекомендованные для определения *M. synoviae*) и Фриза (рекомендованные для определения микоплазм, которые имеют происхождение, отличное от птичьего). В ЯФ XVII информация о питательных средах не представлена и содержится только информация о культивировании в течение 14 сут, в ФСША 42-НФ 37, ГФ РБ II, ЕФ 10.0 изложена информация об инкубации жидких сред в течение 21 сут, а твердых сред — не менее 14 сут или

Таблица 4. Альтернативные методы контроля микробиологической чистоты в разных фармакопеях
Table 4. Alternative methods for control of microbiological quality in different Pharmacopoeias

ФСША 42-НФ 37 <1071> USP 42-NF 37 <1071>	ЯФ XVII G4 JP 17 G4	ЕФ 10.0/ГФ РБ II 5.1.6 Ph. Eur. 10.0/Ph. Bel. 2 5.1.6
Методы прямого выявления: 1) Твердофазная цитометрия 2) Проточная цитометрия Direct methods: 1) Solid phase cytometry 2) Flow cytometry	Методы прямого выявления: 1) Твердофазная цитометрия 2) Проточная цитометрия Direct methods: 1) Solid phase cytometry 2) Flow cytometry	Методы прямого выявления: 1) Твердофазная цитометрия 2) Проточная цитометрия 3) Метод прямой эпифлуоресцентной фильтрации Direct methods: 1) Solid phase cytometry 2) Flow cytometry 3) Direct epifluorescent filtration technique
Методы косвенного выявления: 1) Биolumинесценция 2) Микрокалориметрия 3) Амплификация нуклеиновых кислот 4) Метод измерения потребляемого или продуцируемого газа Indirect methods: 1) Bioluminescence 2) Microcalorimetry 3) Nucleic acid amplification 4) Measurement of consumption or production of gas	Методы косвенного выявления: 1) Иммунологические методы 2) Биolumинесценция 3) Метод микроколоний 4) Метод импеданса 5) Метод измерения потребляемого или продуцируемого газа 6) Профили жирных кислот 7) ИК-спектроскопия 8) Масс-спектрометрия 9) Амплификация нуклеиновых кислот 10) Методы аутентификации клеточных линий 11) Высокопроизводительное секвенирование Indirect methods: 1) Immunological methods 2) Bioluminescence 3) Microcolony method 4) Impedance method 5) Measurement of consumption or production of gas 6) Fatty acid profiles 7) Infrared spectroscopy 8) Mass spectrometry 9) Nucleic acid amplification 10) Cell line authentication 11) High-throughput sequencing	Методы косвенного выявления: 1) Иммунологические методы 2) Биolumинесценция 3) Метод микроколоний 4) Метод импеданса 5) Метод измерения потребляемого или продуцируемого газа 6) Профили жирных кислот 7) ИК-спектроскопия 8) Масс-спектрометрия 9) Амплификация нуклеиновых кислот 10) Методы аутентификации клеточных линий 11) Микрокалориметрия 12) Турбидиметрия 13) Метод, основанный на бактериофагах (только в ГФ РБ) 14) Разработка питательных сред для детекции микроорганизмов 15) Биохимический анализ, основанный на физиологических реакциях Indirect methods: 1) Immunological methods 2) Bioluminescence 3) Microcolony method 4) Impedance method 5) Measurement of consumption or production of gas 6) Fatty acid profiles 7) Infrared spectroscopy 8) Mass spectrometry 9) Nucleic acid amplification 10) Cell line authentication 11) Microcalorimetry 12) Turbidity 13) Bacteriophage-based method (only in Ph. Bel.) 14) Development of culture media for detection of microorganisms 15) Biochemical assays based on physiological reactions

Примечание. ФСША-НФ — фармакопея США—Национальный формуляр, ЯФ — фармакопея Японии, ЕФ — Европейская фармакопея, ГФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь.

Note. USP-NF—United States Pharmacopoeia and National Formulary, JP—Japanese Pharmacopoeia, Ph. Eur.—European Pharmacopoeia, Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus.

Таблица 5. Условия проведения испытания на пирогенность в разных фармакопеях
Table 5. Pyrogen test conditions in different pharmacopoeias

Параметр Parameter	ГФ РФ XIV Ph. Rus. 14	ФСША 42-НФ 37 USP 42-NF 37	ЯФ XVII JP 17	ЕФ 10.0/ГФ РБ II Ph. Eur. 10.0/Ph. Bel. 2
Объем инъекции, мл Injection volume, mL	0,2–10	10		0,5–10
Время введения дозы, мин (не более) Duration of administration, min (max)	2	10		4

Примечание. ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации, ФСША-НФ — фармакопея США—Национальный формуляр, ЯФ — фармакопея Японии, ЕФ — Европейская фармакопея, ГФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь.

Note. Ph. Rus.—State Pharmacopoeia of the Russian Federation, USP-NF—United States Pharmacopoeia and National Formulary, JP—Japanese Pharmacopoeia, Ph. Eur.—European Pharmacopoeia, Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus.

20–21 сут, если необходим пересев (который инкубируется в течение 7 сут).

В соответствии с ГФ РФ XIV среда считается чувствительной и признается годной для использования, если «не позднее 7 суток инкубации визуально обнаруживают рост стандартного образца тест-штамма *M. arginini* G 230 при посеве 10–100 КОЕ», не уточняя, в каком количестве должен быть выявлен рост тест-штамма, а в ФСША 42-НФ 37 и ЯФ XVII указано «приблизительно 100 КОЕ или 100 изменяющих цвет единиц», растущих в выбранных условиях инкубации. ЕФ 10.0 и ГФ РБ II не предоставляют подобной информации.

Еще одним различием между фармакопеями является наличие информации о показателях влажности и процентного соотношения CO₂ при инкубации в описании культурального метода (регламентируются только в ЯФ XVII и ФСША 42-НФ 37). Также только в ЯФ XVII отсутствует описание определения ингибирующего действия испытуемого образца.

Во всех фармакопеях в качестве методов контроля микоплазм предлагаются культуральный и цитохимический методы, а также отмечается, что допустимо использование методов амплификации нуклеиновых кислот.

Бактериальные эндотоксины

Присутствие бактериальных эндотоксинов (БЭ), являющихся пирогенами, в инъекционных препаратах может стать причиной различных реакций организма: от лихорадки до необратимого и смертельного септического шока [1]. Поэтому основные источники БЭ (КЛ и все вспомогательные вещества), используемые для производства продуктов на основе КЛ, проверяются на содержание БЭ.

Правила определения содержания БЭ одинаковы во всех фармакопеях. Определяющий тест основан на специфической реакции лизата амёбоцитов из крови мечехвоста (*Limulus polyphemus* или *Tachypleus tridentatus*) с БЭ, в результате которой происходит изменение реакционной смеси, пропорциональное концентрации БЭ. Во всех ОФС предлагается перед испытанием предварительно подтверждать чувствительность лизата амёбоцитов, а также проводить испытание на наличие мешающих реакции факторов.

Тест может проводиться тремя методами: гель-тромб, турбидиметрический и хромогенный. Все фармакопеи регламентируют использование качественного гель-тромб метода в качестве арбитражного (в случае сомнений и разногласий).

По требованиям фармакопей допустимое содержание БЭ составляет 5 ЕЗ/кг в 1 ч для испытуемого лекарственного препарата при пути введения, отличном от интратекального.

Безопасность

Пирогенность. Помимо теста на БЭ существует биологический метод определения пирогенности на кроликах. Он представлен во всех фармакопеях и основан на измерении температуры тела у кроликов до и после инъекции исследуемого продукта.

ОФС всех фармакопей описывают требования к содержанию животных и их подготовке к проведению испытания. Для испытания пригодны здоровые кролики массой не менее 1,5 кг.

Испытуемый продукт нагревают до температуры (37 ± 2) °С и вводят в ушную вену в определенном объеме и за определенный период времени, указанные в каждой ОФС (табл. 5).

Тест проводится на группе из трех кроликов, результат оценивается на основе суммы индивидуальных максимальных значений повышения температуры. Измерения температуры после внутривенного введения проводят с интервалом не более 30 мин на протяжении трех часов.

Испытание можно проводить поэтапно, прибавляя на каждом этапе по три особи. Максимальное количество этапов в ГФ РФ XIV, ЕФ 10.0 и ГФ РБ II не должно превышать 4, в ФСША 42-НФ 37 и ЯФ XVII — 3.

Исследуемый продукт признается пирогенным, если в результате всех этапов испытания зарегистрировано индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 °С более чем у трех кроликов (в ГФ РФ XIV и ФСША 42-НФ 37) или если результат выше указанного в ОФС значения (табл. 6).

Вирусная безопасность. При производстве продуктов, полученных с использованием материалов человеческого или животного происхождения, существует риск вирусной контаминации.

ЕФ 10.0 и ГФ РБ II только кратко передают смысл общих требований к вирусной безопасности и ссылаются для более подробных рекомендаций на руководство ICH Q5A(R1)¹⁷. Требования, описанные в руководстве, совпадают с описанными в ОФС ФСША 42-НФ 37.

В ОФС указывается, что риску вирусной контаминации подвержены продукты, полученные из ткани, органа или жидкости живых доноров, а также при культивировании КЛ *in vitro* и *in vivo*. Причинами возникновения вирусной контаминации могут быть использование изначально инфицированных вспомогательных материалов и КЛ или же внесение постороннего контаминанта (неэндогенного вируса) в процессе производства. Таким образом, все фармакопеи выделяют ключевые пункты для контроля вирусной безопасности: выбор и оценка исход-

¹⁷ ICH Q5A(R1) Quality of biotechnological products: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin, 1997.

ного материала, оценка производственного процесса и возможности элиминации и/или инактивации вирусов, а также контроль конкретных свойств продуктов на соответствующих этапах производства.

Что касается КЛ, то возможными способами контаминации вирусами главного и рабочего банков клеток могут быть: получение КЛ от инфицированного донора; использование вируса для получения immortalized КЛ; использование контаминированных биологических реагентов, таких как сыворотка крови животных; контаминация во время обработки клеток. Во всех фармакопеях содержится информация о том, что помимо этого КЛ сама по себе может иметь латентную или персистирующую вирусную инфекцию (например, герпесвирус) или эндогенный ретровирус, что следует учитывать. Такие вирусы могут в процессе культивирования перейти из латентной фазы в активную (инфекционную).

В ЯФ XVII рекомендуется проверять исходные КЛ человека на наличие возбудителей гепатитов В, С и ВИЧ методами амплификации нуклеиновых кислот. В фармакопеях России и США не конкретизирована информация о методах и объемах тестирования на вирусную контаминацию, которые зависят от множества факторов и учитываются в индивидуальном порядке. ОФС ФСША 42-НФ 37 и ЯФ XVII рекомендуют однократное проведение тестов на вирусы для главного и рабочего банков клеток и КЛ предельного для производства клеточного возраста *in vitro* (клетки, находящиеся на максимальном уровне удвоения популяции). Главные банки клеток должны тестироваться на эндогенные и неэндогенные вирусы, рабочие банки клеток — только на неэндогенные вирусы, а КЛ предельного для производства клеточного возраста *in vitro* — на эндоген-

ные вирусы, которые могли быть не обнаружены в банках клеток. Примеры рекомендуемых тестов описаны только в ФСША 42-НФ 37 (табл. 7).

Исследования *in vitro* включают в себя инокуляцию исследуемого материала в различные восприимчивые индикаторные КЛ и обнаружение как цитопатических, так и гемадсорбирующих вирусов. Исследования *in vivo* предполагают введение исследуемого материала новорожденным и взрослым мышам, а также куриным эмбрионам. Исследования выработки антител проводят для того, чтобы выявить видоспецифичные вирусы, присутствующие в КЛ грызунов. Для этого инокуляцию проводят здоровым животным и оценивают уровень сывороточных антител или изменение ферментативной активности.

Кроме того, ФСША 42-НФ 37 и ЯФ XVII предусматривают необходимость тестирования необработанного нерасфасованного продукта, который представляет собой один или несколько объединенных сборов клеток и культуральной среды. Для проверки рекомендуются скрининговые тесты *in vitro* с использованием одной или нескольких КЛ, а также методы амплификации нуклеиновых кислот или другие подходящие.

Во всех ОФС процесс производства должен включать один или несколько этапов элиминации и/или инактивации вирусов, для которых доказано снижение концентрации модельных вирусов. Для оценки процесса элиминации и/или инактивации в ФСША 42-НФ 37 и ЯФ XVII предлагается использование специфических и неспецифических, а также релевантных (только в ФСША 42-НФ 37) модельных вирусов, которые выбираются с учетом следующих характеристик: ДНК- или РНК-содержащий вирус; с оболочкой или без нее; размер генома вируса; резистентность к физико-химическим

Таблица 6. Оценка результатов испытания на пирогенность согласно разным фармакопеям
Table 6. Evaluation of pyrogen test results according to different pharmacopoeias

Количество кроликов Number of rabbits	Продукт считается пирогенным, если сумма повышения температур (°C) превышает: Product is considered pyrogenic if the sum of the temperature rises (°C) exceeds:			
	ГФ РФ XIV Ph. Rus. 14	ФСША 42-НФ 37 USP 42-NF 37	ЯФ XVII JP 17	ЕФ 10.0/ ГФ РБ II Ph. Eur. 10.0/ Ph. Bel. 2
3	2,8	—	3,0	2,65
6	4,3	—	4,2	4,3
8	—	3,3	—	—
9	6,0	—	5,0	5,95
12	6,6	—	—	6,6

Примечание. ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации, ФСША-НФ — фармакопея США—Национальный формуляр, ЯФ — фармакопея Японии, ЕФ — Европейская фармакопея, ГФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь.
«—» нет данных.

Note. Ph. Rus.—State Pharmacopoeia of the Russian Federation, USP-NF—United States Pharmacopoeia and National Formulary, Ph. Eur.—European Pharmacopoeia, Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus, JP—Japanese Pharmacopoeia.
— no data available.

Таблица 7. Примеры тестов на вирусы для банков клеток и клеток предельного для производства клеточного возраста *in vitro* в фармакопее США
Table 7. Examples of USP virus tests for cell banks and cells at the limit of *in vitro* cell age used for production

Наименование тестов на Tests for	
ретровирусы и другие эндогенные вирусы retroviruses and other endogenous viruses	неэндогенные вирусы non-endogenous viruses
1. Инфицирующая способность Infectivity	1. Исследования <i>in vitro</i> In vitro assays
2. Электронная микроскопия Electron microscopy	2. Исследования <i>in vivo</i> In vivo assays
3. Обратная транскрипция Reverse transcriptase	3. Исследования выработки антител Antibody production tests
4. Прочие вирус-специфичные тесты Other virus-specific tests	4. Прочие вирус-специфичные тесты Other virus-specific tests

воздействиям и др. Для валидации необходимо подобрать минимум три модельных вируса.

Кроме того, в ФСША 42-НФ 37 и ЯФ XVII приводятся перечень вирусов, используемых для исследований: вирус везикулярного стоматита, вирус парагриппа, вирус лейкемии мышей (MuLV) и др. Тип и объем тестов и исследований зависят от множества факторов и подбираются индивидуально и поэтапно для каждого процесса производства.

В фармакопеях предлагаются физические, химические и комбинированные методы элиминации и/или инактивации вирусов.

Тестирование конечного продукта в ГФ РФ XIV предусматривает проверку на гепатит В, С, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, другие фармакопеи не конкретизируют необходимость тестирования конечного продукта, при этом в ЯФ XVII рекомендуется тестирование конечного продукта методами амплификации нуклеиновых кислот, ориентируясь на наиболее опасный вирус среди тех, которые могут присутствовать. Во всех ОФС акцентируется внимание на том, что вирусная безопасность конечного продукта может быть всецело обеспечена за счет тщательной подготовки и подтверждения того, что процесс производства обеспечивает элиминацию и/или инактивацию вирусов.

В отличие от других фармакопей, в ФСША 42-НФ 37 представлена ОФС <1237>, в которой подробно описаны вирусологические методы исследования. Весь текст ОФС делится на три раздела, в каждом описывается обнаружение и анализ наиболее важных групп вирусов, а также наиболее часто используемые для этого молекулярно-биологические и иммунологические методы.

Вспомогательные материалы. Во всех фармакопеях общее представление о требованиях к вспомогательным материалам биологического происхождения приводится в ОФС с общими требованиями к качеству КЛ. Отдельные ОФС по вспомогательным материалам представлены только в ФСША 42-НФ 37 и ЕФ 10.0. ОФС ГФ РФ XIV и ЯФ XVII о вирусной безопасности только указывают на необходимость наличия информации о проверке реагентов и сырья.

К вспомогательным материалам биологического происхождения относятся сыворотки, культуральная среда, пищеварительные ферменты, факторы роста и другие вещества, а также фидерные клетки (только в ФСША 42-НФ 37). В ЕФ 10.0 они подразделяются на четыре класса: сыворотка и ее производные; белки, полученные с помощью технологии рекомбинантной ДНК; белки, экстрагированные из биологического материала, и векторы. В ФСША 42-НФ 37 выделяются материалы для предполагаемого использования: в терапевтических целях, в исследовательских целях.

Во всех ОФС описывается риск-ориентированный подход, требования к качеству материалов и испытания, которые должны предоставляться в сертификате анализа на эти материалы. В них указано, что ответственность за квалификацию лежит на производителе вспомогательных материалов, а ответственность за обеспечение качества продукта — на пользователе. Кроме того, в ФСША 42-НФ 37 предлагается возможность создания программы квалификации, которая оценивает риск, учитывая количество используемых для производства вспомогательных материалов и этап их внедрения в процесс.

Качество вспомогательных материалов может влиять на стабильность, безопасность, активность и чистоту конечного продукта. Поэтому необходим тщательный контроль до и в про-

цессе производства, а также проверка содержания в конечном продукте во избежание таких нежелательных последствий, как иммунный ответ, токсические эффекты или ухудшение эффективности [2]. Помимо этого, вспомогательные материалы могут быть источником контаминации. Все материалы, которые контактируют с КЛ, должны быть известного происхождения, прослеживаться и иметь подтвержденные подлинность, чистоту, стерильность, биологическую активность, а также отсутствие вирусной контаминации и оценку риска передачи трансмиссивной губчатой энцефалопатии. По возможности рекомендуется замена использования материалов человеческого и животного происхождения на синтетические, или, если это невозможно, минимизация риска передачи посторонних агентов.

Особое внимание во всех фармакопеях уделено проверке определенных реактивов и материалов на вирусную контаминацию. В ГФ РФ XIV и ЯФ XVII отмечено, что бычья сыворотка не должна содержать потенциально опасные для человека вирусы (вирус бычьей диареи, инфекционного бычьего ринотрахеита и парагриппа 3). Получаемый от свиней трипсин необходимо проверять на наличие парвовируса свиней. Другим примером может служить протокол культивирования кератиноцитов для использования в медицинской практике по методике Rheinwald и Green [3] с применением мышинных фибробластов в качестве фидерных клеток. Поскольку многие видоспецифичные вирусы, присутствующие в КЛ грызунов, могут передаваться человеку, в таких случаях необходимо проводить тщательные исследования фидерных клеток на наличие вирусов.

Подробно описывается только в ФСША 42-НФ 37 оценка (иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР)) и удаление остаточных вспомогательных материалов. Они включают разработку этапов удаления путем разбавления, разделения или инактивации, а также путем разработки анализов для своевременного обнаружения и оценки количества таких реактивов во время производства и в конечном продукте.

Трансмиссивная губчатая энцефалопатия (ТГЭ). Обязательным требованием для материалов животного происхождения является принятие мер по снижению риска передачи ТГЭ, поскольку это может стать причиной инфицирования КЛ, находящейся в составе конечного продукта. Подробные ОФС существуют во всех фармакопеях, кроме ФСША 42-НФ 37 (в США рекомендации на эту тему прописаны в документах Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA)). Требования фармакопей разных стран идентичны.

Исходные материалы, используемые в производстве, должны быть получены от животных, пригодных для использования в пищу человеком и выдержавших до и после забоя проверку в соответствии с требованиями регуляторных органов, за исключением материалов, полученных из живых животных, которые признаны здоровыми по результатам клинического обследования. Существует классификация стран по степени риска передачи ТГЭ от Всемирной организации по охране здоровья животных: с незначительным риском, с контролируемым риском и с неопределенным риском¹⁸. Безопасными являются материалы из стран с незначительным риском. По возможности следует использовать аналоги таких материалов синтетического происхождения. Кроме того, органы и ткани классифицируются по различному уровню инфекционности: высокая инфекционная активность, более низкая инфекционная активность и без обнаруженной инфекционной активности¹⁹.

¹⁸ Bovine spongiform encephalopathy (BSE). The World Organisation for Animal Health. <https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/official-disease-status/bse/list-of-bse-risk-status>

¹⁹ WHO Tables on tissue infectivity distribution in transmissible spongiform encephalopathies (WHO/EMP/QSM/2010.1); 2010.

При выборе исходного материала следует учитывать обе классификации.

В процесс производства допускается вводить стадии удаления или инактивации возбудителей ТГЭ, при этом должна быть доказана эффективность таких мер, поскольку возбудители ТГЭ устойчивы к большинству процедур по инаktivации. Все фармакопеи описывают методы инаktivации ТГЭ: физический (нагревание, измельчение и др.), химический (ферментативная обработка и др.) и комбинированный.

Все ОФС содержат требования для отдельных, наиболее значимых материалов, таких как эмбриональная бычья сыворотка, коллаген и др.

Криоконсервация клеточных линий. Среди всех фармакопей только в ФСША 42-НФ 37 уделяется особое внимание криоконсервации КЛ и продуктов на их основе: описываются основные криопротекторы, механизмы их действия и важность анализа токсичности при разработке новых протоколов криоконсервации для оценки потери жизнеспособности или изменения функциональности КЛ.

Также ОФС содержит конкретные рекомендации по криоконсервации гемопоэтических стволовых клеток (СК), мезенхимальных СК, лимфоцитов и плюрипотентных СК человека.

Методы подтверждения безопасности клеточных линий. Во всех фармакопеях в ОФС, относящихся к показателю качества «Безопасность», в качестве основных используемых методов указываются методы амплификации нуклеиновых кислот и иммунологические.

В ФСША 42-НФ 37, ЕФ 10.0 и ГФ РБ II содержатся ОФС, посвященные методам амплификации нуклеиновых кислот, ГФ РФ XIV содержит ОФС только об одном из них — ПЦР, ЯФ XVII не имеет отдельных статей по молекулярно-генетическим методам (они описываются в других ОФС по факту применения).

Методам амплификации нуклеиновых кислот в ФСША 42-НФ 37 посвящены шесть ОФС. В двух описываются: общее представление, перечень методов, основные термины, процедуры выделения и обработки нуклеиновых кислот. Отдельная ОФС посвящена амплификации, основным компонентам анализа, вариантам ПЦР, правилам их проведения и оптимизации, а также обеспечению качества. По смыслу вышеописанные ОФС совпадают с текстами из ГФ РФ XIV, ЕФ 10.0 и ГФ РБ II. Далее только в ФСША 42-НФ 37 представлены ОФС с информацией о микрочипах и методах генотипирования (метод коротких tandemных повторов, пиросеквенирование и др.). Последняя ОФС посвящена методам определения остаточной ДНК. В России представлен проект такой ОФС. Согласно текстам обеих статей, приемлемым считается содержание остаточной ДНК не более 10 нг на дозу.

ОФС, посвященные иммунологическим методам, представлены во всех фармакопеях без исключения, при этом в ГФ РФ XIV и ЯФ XVII описан только один из них — ИФА. Как и в случае с методами амплификации нуклеиновых кислот, в ФСША 42-НФ 37 представлены несколько ОФС по иммунологическим методам. Отдельно представлена информация об общем описании и видах иммунологических методов (ИФА, вестерн-блот и др.). Эта ОФС аналогична ОФС ЕФ 10.0 и ГФ РБ II, другая ОФС — об ИФА, информация о котором совпадает в статьях ФСША 42-НФ 37, ГФ РФ XIV и ЯФ XVII. Также есть статья, посвященная иммуноблоту, который в зависимости от наличия или отсутствия электрофоретического разделения можно разделить на вестерн-блот и слот/дот-блот. В ГФ РФ XIV также присутствует ОФС с описанием вестерн-блота.

Подлинность, активность клеточной линии

Для изучения подлинности и активности КЛ используются описанные выше методы амплификации нуклеиновых кислот и иммунологические, а также проточная цитометрия, подробное описание которой представлено в отдельной ОФС во всех фармакопеях (в России — проект ОФС), кроме ЯФ XVII. Как и в случае с методами амплификации нуклеиновых кислот, в ЯФ XVII упоминается данный метод только по факту применения в других ОФС. Все фармакопеи приводят технические аспекты метода, в том числе оборудование, подготовку образцов, их окрашивание и анализ данных. Помимо иммунофенотипирования указаны такие примеры применения проточной цитометрии, как количественное определение популяций клеток, анализ пролиферативной активности и другие функциональные анализы.

Жизнеспособность

Отдельная ОФС по контролю качества по показателю «Жизнеспособность» приведена только в ЕФ 10.0 и ГФ РБ II. Для определения количества жизнеспособных клеток используют методы ручного (гемоцитометр) и автоматического (счетчик клеток или проточная цитометрия) подсчета с применением метода окрашивания. Анализ жизнеспособности основан на проникновении красителя в мертвые или поврежденные клетки, жизнеспособные клетки остаются неокрашенными. При ручном подсчете наиболее часто используемым красителем является трипановый синий, при автоматическом — 7-амино-актиномицин D или пропидий-йодид, также в обоих случаях могут быть использованы другие подходящие красители.

Другие фармакопеи описывают оценку жизнеспособности в ОФС Проточная цитометрия.

рН

Если для продукта, содержащего КЛ, применимо измерение рН, должен быть указан диапазон допустимых значений, оцененный согласно ОФС, которые содержатся во всех рассмотренных фармакопеях.

Заключение

Проблема выбора и применения методов оценки качества КЛ, входящих в состав БМКП, является актуальной как для разработки, так и для проведения экспертизы качества БМКП вследствие отсутствия в настоящее время регламентирующего национального документа, подобного ГФ РФ XIV для ЛС. Однако, учитывая наличие опыта применения в Российской Федерации фармакопейных методов для оценки качества КЛ, являющихся субстратами для производства некоторых биологических лекарственных препаратов, некоторые ОФС (рассмотренные в данном обзоре) могут быть применены и для оценки качества КЛ человека, входящих в состав БМКП. В то же время существует и необходимость разработки ОФС (или аналогов ОФС) непосредственно для оценки качества БМКП и КЛ, входящих в их состав, в рамках проведения экспертизы качества. Рассмотренные подходы и методы оценки качества препаратов на основе клеток и тканей, содержащиеся в ОФС ФСША 42-НФ 37 и ЕФ 10.0, могут служить основой для разработки ОФС в России, например для определения подлинности, активности, вирусной безопасности и микоплазм в КЛ БМКП методами, основанными на амплификации нуклеиновых кислот.

Вклад авторов. *М. А. Водякова* — анализ и обобщение данных, изложенных в нормативных документах, написание, доработка текста; *А. Р. Сайфутдинова* — сбор и систематизация данных; *Е. В. Мельникова* — идея, концепция и дизайн исследования, обобщение результатов исследования; *Ю. В. Олефир* — интерпретация результатов исследования, окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. *Marina A. Vodyakova*—analysis and consolidation of data from regulatory documents, writing and revising the text; *Aliya R. Sayfutdinova*—collection and systematisation of data; *Ekaterina V. Melnikova*—elaboration of the idea, concept and design of the study, summarising the study results; *Yuri V. Olefir*—interpretation of the study results, final approval of the version 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 FSBI "SCEEMP" of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590045-2).

Конфликт интересов. Ю. В. Олефир является главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Yuri V. Olefir is the Editor-in-chief of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Ryan J. Endotoxins and cell culture. *Technical Bulletin*. USA: Corning; 2008.
2. Vodiakova MA, Sayfutdinova AR, Melnikova EV, Goryaev AA, Sadchikova NP, Gegechkori VI, et al. Production of biomedical cell products: requirements for the quality of donor material and excipients of animal origin (review). *RSC Med Chem*. 2020;11:349–57. <https://doi.org/10.1039/C9MD00529C>
3. Rheinwald JG, Green HA. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975;6(3):331–43. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(75\)80001-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(75)80001-8)

Об авторах / Authors

Водякова Марина Андреевна. *Marina A. Vodyakova.* ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6008-0554>

Сайфутдинова Алия Равиловна. *Aliya R. Sayfutdinova.* ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4735-7800>

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

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. *Yuri V. Olefir, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate.* ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

Поступила 16.06.2020

После доработки 05.08.2020

Принята к публикации 28.08.2020

Received 16 June 2020

Revised 5 August 2020

Accepted 28 August 2020

Эффективность специфической профилактики клещевого энцефалита

М. С. Щербинина*, О. А. Бархалева, О. С. Дорохова, А. А. Мовсесянц

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

Вакцинация по-прежнему остается единственной мерой профилактики клещевого энцефалита. Все вакцины для профилактики данного заболевания разработаны на основе штаммов дальневосточного и европейского подтипов вируса клещевого энцефалита. В настоящее время на большей территории России генетическая популяция вируса клещевого энцефалита представлена на 80–100% сибирским подтипом вируса, который отличается от штаммов, используемых для приготовления вакцин. В разные годы в стране показатель вакцинированных среди заболевших клещевым энцефалитом составлял 3,9% в 2012 г., 1,5% в 2018 г., в том числе регистрировались летальные случаи. В связи с этим перспективным направлением исследований является оценка эффективности вакцинации против различных генетических типов вируса клещевого энцефалита. Цель работы — анализ исследований эффективности специфической профилактики клещевого энцефалита против различных генетических типов вируса. В обзоре представлен анализ данных эффективности вакцинопрофилактики клещевого энцефалита в экспериментальных и реальных условиях. Показано, что вакцинопрофилактика клещевого энцефалита в условиях охвата прививками не менее 80% населения является эффективным способом защиты от клещевого энцефалита. Представлены данные многолетнего изучения устойчивости, протективной активности вакцинального иммунитета против штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных на высокоэндемичных территориях. Установлено, что все вакцины для профилактики клещевого энцефалита обладают высокой иммуногенной активностью и способствуют выработке устойчивых протективных антител против штаммов трех генетических подтипов вируса. Показано, что защитная эффективность вакцинации зависит от числа полученных прививок, схем вакцинации, пола и возраста привитых. Сделан вывод о необходимости дальнейшего изучения эффективности вакцин против клещевого энцефалита для совершенствования тактики вакцинопрофилактики, понимания причин заболеваемости и летальности среди вакцинированных лиц.

Ключевые слова: клещевой энцефалит; вирус клещевого энцефалита; вакцинопрофилактика; эффективность вакцинации; специфические антитела; защитный титр антител

Для цитирования: Щербинина МС, Бархалева ОА, Дорохова ОС, Мовсесянц АА. Эффективность специфической профилактики клещевого энцефалита. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(3):174–186. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-174-186>

Контактное лицо: Щербинина Мария Сергеевна; Shcherbinina@expmed.ru

Effectiveness of Specific Prevention of Tick-Borne Encephalitis

M. S. Shcherbinina*, O. A. Barkhaleva, O. S. Dorokhova, A. A. Movsesyants

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

Vaccination remains the only way to prevent tick-borne encephalitis (TBE). All TBE vaccines are based on strains of the Far Eastern and European subtypes of TBE virus. Currently, the Siberian subtype of the virus, which differs from the vaccine strains, accounts for 80–100% of the genetic population of TBE virus in most of Russia. The proportion of TBE vaccinated patients among those infected was different from year to year in Russia, e.g. 3.9% in 2012 and 1.5% in 2018, there were also some fatal cases registered among vaccinated patients. In this regard, evaluation of the effectiveness of vaccination against various genetic subtypes of TBE is a promising area of research. The purpose of this study was to summarise the results of studies investigating effectiveness of specific prevention of TBE as regards various genetic subtypes of the virus. The paper analyses data on the effectiveness of TBE vaccination in experimental settings and in real life. It was demonstrated that the use of vaccines for prevention of TBE is effective, provided the vaccination coverage is not less than 80%. The paper cites the data from a long-term study of the stability and protective activity of vaccine immunity against TBE virus strains isolated in highly endemic territories. It was established that TBE vaccines have high immunogenic activity and contribute to the production of stable protective antibodies against the strains of the three genetic subtypes of the virus. Protective efficacy of vaccination depends on the number of vaccinations received, the vaccination scheme, gender and age of those vaccinated. The paper concludes by saying that further studies are needed to assess TBE vaccine efficacy in order to improve vaccination tactics, to better understand causes of morbidity and mortality among vaccinated individuals.

Key words: tick-borne encephalitis; tick-borne encephalitis virus; preventive vaccine; vaccination efficacy; specific antibodies; protective antibody titer

For citation: Shcherbinina MS, Barkhaleva OA, Dorokhova OS, Movsesyants AA. Effectiveness of specific prevention of tick-borne encephalitis. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(3):174–186. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-174-186>

Corresponding author: Mariya S. Shcherbinina; Shcherbinina@expmed.ru

Клещевой энцефалит (КЭ) — вирусное заболевание, возникающее после присасывания иксодовых клещей, инфицированных вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ), который способен поражать отделы центральной нервной системы. Эта инфекция характеризуется полиморфизмом клинических проявлений, от легких форм с abortивным течением до тяжелых очаговых форм, характеризующихся развитием парезов, параличей вплоть до летальных исходов, а также развитием хронических форм КЭ [1, 2].

Показатель заболеваемости КЭ в Российской Федерации в 2018 г. составил 1508 случаев, в том числе 153 ребенка до 14 лет. Интенсивный показатель заболеваемости составлял 1,03 на 100 тыс. населения [3].

Расшифровка полной нуклеотидной последовательности геномов штаммов ВКЭ, проведенная А. Г. Плетневым с соавт. [4], П. Ф. Сафроновым с соавт. [5], С. W. Mandl с соавт. [6], позволила установить существование трех основных генотипов ВКЭ: дальневосточный генотип с прототипными штаммами — Софьин, 205; европейский генотип — штаммы К-23, Найдорф; сибирский генотип — штаммы Васильченко, Зайсаев.

В Восточной Сибири обнаружены уникальные штаммы — 178-79 и 886-84. Генетическая структура штаммов отличается «мозаичностью» структуры генов и, как следствие, чередованием аминокислотных последовательностей, специфичных для трех известных генотипов ВКЭ [7–9]. Штамм 178-79 предложен авторами обозначать как самостоятельный генотип 4. Данный штамм является единственным в данной группе. С помощью молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот и метода секвенирования была выявлена группа из 13 штаммов, гомологичных штамму 886-84. Данную группу предложено обозначать как группа 886, а также присвоить статус самостоятельного генотипа 5¹ [9, 10].

Согласно данным В. И. Злобина с соавт. [7], каждый генотип имеет свой ареал доминирования. Территория Дальнего Востока является природным очагом для дальневосточного генотипа ВКЭ (генотип 1) [7, 8, 11]. Показано, что на данной территории циркулируют штаммы дальневосточного подтипа, которые подразделяются на три кластера: Sofjin-, Senzhang-, Shkotovo-подобные штаммы [11]. Ареалом циркуляции европейского генотипа ВКЭ (генотип 2) является Центральная и Северная Европа [8], европейская территория России, Урал, Восточная и Западная Сибирь [7, 8, 12, 13]. Сибирский подтип ВКЭ выявляется в европейской части России (Ярославская, Костромская, Вологодская области) [13–15], на Урале (Курганская, Свердловская, Челябинская области) [15–17], в Восточной (Иркутская, Читинская области, Красноярский край, Республика Хакасия) и Западной Сибири (Кемеровская область) [15, 16, 18, 19]. В целом это свидетельствует о совместной циркуляции европейского и сибирского подтипов ВКЭ.

В Российской Федерации для профилактики КЭ применяются в основном вакцины отечественного производства, разработанные на основе дальневосточных штаммов, а именно: Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая производства ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» для взрослых и детей с 3-летнего возраста (0,5 мл). В 2010 г. на основе технологии производства этой вакцины была разработана и внедрена вакцина Клещ-Э-Вак (Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная) для взрослых с 16 лет (0,5 мл) и детей с одного года (0,25 мл) [20–22]. Для производства вакцин используется дальневосточный штамм ВКЭ Софьин. Данный штамм впервые был выделен в 1937 г. во время экспедиции на Дальний Восток под руководством Л. А. Зильбера. Вакцины для профилактики КЭ культуральные очищенные концентрированные инактивированные сорбированные производства АО «НПО «Микроген» («НПО «Вирион», г. Томск) — Энцевир® для взрослых с 18-летнего возраста (0,5 мл), Энцевир® Нео для детей с 3-летнего возраста (0,25 мл) [21–23]. Для производства вакцин используется дальневосточный штамм ВКЭ 205, который был выделен из клещей *Ixodes persulcatus* в 1973 г. в Хабаровском крае [22–24].

В Европе для профилактики КЭ применяются культуральные инактивированные очищенные сорбированные вакцины, разработанные на основе европейских штаммов. Вакцина FSME-IMMUN® Junior² для детей с 1 года в прививочной дозе 0,25 мл, FSME-IMMUN® для взрослых с 16 лет в дозе 0,5 мл (Pfizer, Inc., Австрия)³ [20, 21, 25]. Для производства вакцин используется штамм Найдорф, выделенный в 1971 г. из клещей *I. ricinus* в Австрии. В Германии (GSK Vaccines, GmbH) используются вакцины против КЭ культуральные инактивированные очищенные жидкие с адьювантом для детей с 1 года до 11 лет Encerpur® Children (0,25 мл), для взрослых Encerpur® Adults (0,5 мл) с 12 лет, разработанные на основе штамма К-23, выделенного в 1975 г.⁴ [21].

Таким образом, с момента открытия ВКЭ, а также изоляции вакцинных штаммов прошло более 80 лет. За это время изменилось представление о генетической структуре популяции ВКЭ на различных эндемичных по ВКЭ территориях. В настоящее время доминирующим подтипом ВКЭ на большей территории России является сибирский подтип, который отличается от вакцинных штаммов [7]. Несмотря на то что вакцинация является единственным способом профилактики КЭ, она не обеспечивает 100% защиту от КЭ. Заболевания КЭ, а также летальные случаи среди привитых лиц регистрируются на всей эндемичной по КЭ территории России, где генетическая популяция представлена всеми подтипами ВКЭ. Таким образом, в связи с имеющимися данными о генотипическом пейзаже

¹ Верховина ММ. Молекулярная эпидемиология и экология вируса клещевого энцефалита в Восточной Сибири: дис. ... д-ра биол. наук. Иркутск; 2014.

² ФСМЕ-ИММУН® Джуниор (Вакцина клещевого энцефалита культуральная инактивированная очищенная сорбированная). <https://grls.rosminzdrav.ru>

³ Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2011;86(24):241–56. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/241769/WER8624_241-256.PDF?sequence=1&isAllowed=y

Kollaritsch H, Krasilnikov V, Holzmann H, Karganova G, Barrett A, Süss J, et al. Background document on vaccines and vaccination against tick-borne encephalitis (TBE). https://www.who.int/immunization/sage/6_TBE_backgr_18_Mar_net_apr_2011.pdf

⁴ Там же.

ВКЭ, а также случаями заболевания и смерти от КЭ среди вакцинированных лиц большое значение имеет оценка эффективности специфической профилактики КЭ против различных генетических подтипов вируса.

Цель работы — анализ исследований эффективности специфической профилактики клещевого энцефалита против различных генетических типов вируса.

Эффективность специфической профилактики клещевого энцефалита в реальных условиях

Одним из наиболее важных показателей эффективности специфической профилактики является снижение показателей заболеваемости КЭ.

В России рекордно высокие показатели заболеваемости КЭ были зафиксированы в период 1996–1999 гг., когда число случаев КЭ в эпидемический сезон составляло более 9 тыс. Высокий показатель заболеваемости КЭ в этот период приходился на регионы Уральского федерального округа и Предуралья — более 40% [1]. В период 2007–2016 гг. показатель заболеваемости КЭ снизился в 2 раза по сравнению с периодом 1997–2006 гг. с максимальным показателем в Сибирском федеральном округе (до 51,5%) [26].

Вероятно, одной из причин снижения уровня заболеваемости КЭ в России может являться постепенное увеличение объемов вакцинации на отдельных территориях страны⁵ [3, 26].

Свердловская область является высокоэндемичной территорией по КЭ. Показатель заболеваемости в 1996 г. (до массовой вакцинации) составлял $43,0 \pm 2,0$ на 100 тыс. населения, а генетическая популяция ВКЭ представлена только сибирским подтипом ВКЭ [15–17]. В области в период 1997–2012 гг. осуществлялась кампания массовой вакцинопрофилактики КЭ⁶ вакцинами российского и европейского производств: 80% — вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН»), 12% — вакцина клещевого энцефалита культуральная инактивированная очищенная сорбированная ФСМЕ-ИММУН® (Pfizer, Inc., Австрия), 6% — вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная Энцевир® (АО «НПО «Микроген»), 2% — Энцепур® (GSK Vaccines, GmbH, Германия) [27]. В период 1996–2000 гг. была проведена массовая вакцинация населения, которая незначительно повлияла на показатели заболеваемости КЭ. В период 2001–2008 гг. проводилась вакцинация детей 7-летнего возраста с «догоняющей» (т. е. не привитых в календарные сроки) вакцинацией взрослых. Охват детей вакцинацией составил 90–95%, а всего населения — 71,3%. При таком уровне охвата населения вакцинацией показатель заболеваемости снизился в 2 раза. Далее, с 2008 по 2012 гг., начали проводить вакцинацию детей с 15-месячного возраста, а также продолжили «догоняющую» иммунизацию взрослого населения. Охват прививками населения увеличился до 80%, а показатель заболеваемости КЭ снизился до $8,5^{10000}_{0000} \pm 2,4$ (1990–1996 гг. — $16,9 \pm 4,6$ на 100 тыс. населения). Эффективность вакцинации проявилась не только снижением показателя заболеваемости, но и изменением клинических форм заболевания среди вакцинированных пациентов с диагнозом КЭ. Среднемолодежный показатель лихорадочных форм сре-

ди привитых составил $89,98 \pm 3,9\%$, менингеальных форм — $8,43 \pm 3,8\%$, очаговых форм — $1,59 \pm 1,0\%$. Среди непривитых пациентов также преобладала лихорадочная форма КЭ ($63,8 \pm 2,2\%$), менингеальные формы выявлялись в $25,7 \pm 1,5\%$, очаговые формы — в $10,5 \pm 1,7\%$. В Свердловской области к 2015 г. охват прививками населения составил 93,8% [28]. При таком уровне охвата прививками уровень заболеваемости в области в 2015 г. по сравнению с 2012 г. снизился до 2,6 на 100 тыс. населения. На фоне вакцинации у привитых пациентов с диагнозом КЭ по-прежнему преобладала лихорадочная форма КЭ, отсутствовали очаговые формы, а число менингеальных форм было значительно ниже, чем у не привитых. Летальные случаи от КЭ среди вакцинированных лиц не регистрировались.

На отдельных территориях Российской Федерации показатель охвата прививками населения находится на очень низком уровне, но при этом среди групп высокого риска данный показатель может составлять от 40 до 70% и выше. Так, по данным С. В. Лучининой, в Челябинской области в период 2007–2013 гг. осуществлялась программа массовой вакцинации населения против КЭ⁷. В этот период проводилась вакцинация школьников первых классов и детей 3–6 лет. К 2013 г. в области был достигнут охват населения вакцинацией 34,8% (среди детей — 40,2%, взрослых — 9,8%), отдаленными ревакцинациями — до 57% [16]. Специфическая профилактика КЭ осуществлялась препаратами российского и европейского производств⁸ [16, 27]. В 2015 г. охват вакцинацией населения в данном регионе составил 71,3%, а показатель заболеваемости снизился до 1,3 на 100 тыс. населения (2013 г. — 2,55 на 100 тыс. населения). Эффективность специфической профилактики при данном уровне охвата вакцинацией проявилась снижением заболеваемости КЭ, летальности (с 0,14 до 0,06 на 100 тыс. населения) и изменением клинических форм заболевания — среди привитых пациентов чаще выявлялись лихорадочные формы КЭ⁹ [28]. В Ярославской области в 2018 г. охват вакцинацией взрослых составил 18,3%, при этом охват прививками детского населения, проживающего на территориях области с высоким показателем заболеваемости КЭ, составлял более 70% [14]. Отмечается, что на данной территории в период 2008–2018 гг. общее количество лиц, заболевших КЭ, составляло 167 (средний показатель — $1,16 \pm 0,2$ на 100 тыс. населения).

Таким образом, была установлена эффективность специфической профилактики КЭ вакцинами российского и европейского производств в регионах, где доминирующим является преимущественно сибирский подтип ВКЭ.

Эффективность специфической профилактики КЭ была продемонстрирована в Австрии, где применялась культуральная очищенная инактивированная вакцина FSME-IMMUN®, разработанная на основе штамма европейского подтипа ВКЭ, который является доминирующим на данной территории. В период массовой вакцинации населения Австрии охват прививками увеличился с 6 (1986 г.) до 86% (2001 г.) и 90% в регионах с более высоким показателем заболеваемости КЭ. В период 1971–1981 гг. максимальный показатель случаев КЭ приходился на детский возраст — 7–14 лет. К 2000 г. при таком уровне охвата прививками показатель заболеваемости данной категории населения снизился с 19 до 2,3% [25]. В настоящее время в Австрии заболеваемость КЭ находится на спорадическом уровне.

⁵ Есюнина МС. Современные тенденции заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом в условиях различных тактик иммунизации и усовершенствование эпидемиологического надзора и контроля: дис. ... канд. мед. наук. Пермь; 2015.

⁶ Там же.

⁷ Лучинина СВ. Особенности иммунитета к вирусу клещевого энцефалита у населения в природном очаге на Южном Урале: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск; 2015.

⁸ Там же.

⁹ Там же.

Согласно СП 3.1.3.2352-08¹⁰ Профилактика клещевого вирусного энцефалита, охват вакцинацией населения эндемичных регионов по КЭ должен составлять не менее 95%. Данный показатель охвата вакцинацией населения (95%) практически был достигнут только в Свердловской области (2015 г. — 93,8%) [28]. В целом это свидетельствует о недостаточном объеме вакцинацией населения, проживающего на высокоэндемичных по КЭ территориях¹¹ [14, 28].

Таким образом, на основе анализа данных литературы показана эффективность вакцинации современными препаратами против ВКЭ в условиях соответствия и несоответствия природных и вакцинных штаммов, а также показана зависимость эффективности специфической профилактики от уровня охвата вакцинацией населения.

Экспериментальные исследования эффективности специфической профилактики против различных генетических типов вируса клещевого энцефалита

Несмотря на доказанную эффективность вакцинации, по-прежнему регистрируются случаи заболевания среди вакцинированных лиц против КЭ [14, 15, 25, 29–33]. Число привитых лиц среди заболевших КЭ в Российской Федерации составляло в 2012 г. 3,9%¹², в 2018 г. — 1,5% [3]. Причина заболеваемости КЭ среди вакцинированных лиц до конца не изучена. Одной из возможных причин заболеваемости среди привитых против КЭ лиц может являться несоответствие вакцинных и природных штаммов.

Для изучения защитной эффективности вакцин проводились экспериментальные исследования с использованием штаммов всех генетических типов, выделенных в различных эндемичных регионах Российской Федерации.

В экспериментальных исследованиях О. В. Морозова с соавт. [34] показали, что препараты Энцевир®, Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН»), ФСМЕ-ИММУН®, Энцепур® способны индуцировать выработку протективных антител у мышей линии BALB/c против штаммов сибирского подтипа (штаммы Айна, Заусаев) по результатам реакции торможения гемагглютинации (РТГА), иммуноферментного анализа (ИФА), реакции нейтрализации (РН). По данным ИФА, у привитых мышей всеми вакцинами титры антител к штамму Айна составляли от 1:200 до 1:1600. В РН во всех группах привитых, за исключением группы привитых вакциной Энцепур®, титр нейтрализующих антител составлял 1:100. В РТГА антигеммагглютинины против штамма Заусаев были выявлены только у привитых препаратом Энцевир® (1:22,6), ФСМЕ-ИММУН® (1:13,9), Вакциной клещевого энцефалита культуральной очищенной концентрированной инактивированной сухой (1:10,0), при этом доля серопозитивных и уровень титров антигеммагглютининов были выше среди привитых мышей вакциной Энцевир®. В группе привитых вакциной Энцепур® для всех мышей были получены отрицательные результаты (по данным результатов РТГА) и установлены низкие значения титров нейтрализующих антител (1:10 по данным РН). В эксперименте на мышах BALB/c было показано отсутствие защиты от штамма Заусаев сибирского подтипа ВКЭ только у животных, иммунизированных вакциной Энцепур® (МИД₅₀¹³ 0,04 мл), самая высокая защита была отмечена у жи-

вотных, иммунизированных вакциной Энцевир® (МИД₅₀ менее 0,016 мл) [34].

Г. Б. Майкова с соавт. [35] в эксперименте с использованием образцов сывороток крови людей, 2-кратно привитых вакцинами Клещ-Э-Вак и ФСМЕ-ИММУН®, показали способность данных вакцин нейтрализовать штаммы ВКЭ всех подтипов в РН (дальневосточный штамм Софьин, европейский штамм Абсеттаров, сибирский штамм Васильченко). При этом авторы отмечают, что у привитых вакциной ФСМЕ-ИММУН® уровень нейтрализующих антител выше в отношении штамма Софьин сравнительно с гомологичным штаммом Абсеттаров.

О. С. Афонина с соавт. [36], проводя экспериментальные исследования вакцин с использованием метода оценки протективного разведения вакцины, которое обеспечивает защиту 50% иммунизированных мышей от гибели при заражении ВКЭ (ПР₅₀), и минимальной иммунизирующей дозы вакцины, защищающей 50% мышей при заражении ВКЭ, установили более высокие защитные свойства препаратов ФСМЕ-ИММУН®, Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН»), Энцевир® в отношении штаммов дальневосточного подтипа Софьин, европейского подтипа ВКЭ Абсеттаров, сибирского подтипа ВКЭ Лесопарк. Для вакцины Энцепур® была установлена очень низкая иммуногенная (протективная) активность при использовании штаммов Абсеттаров, Софьин, Лесопарк [36]. В РТГА с использованием антигенов штаммов Софьин, Абсеттаров, Лесопарк, ЕК-328, а также в ИФА была доказана способность всех вакцин индуцировать перекрестный иммунный ответ ко всем вышеуказанным штаммам ВКЭ у привитых мышей линии BALB/c. У мышей, иммунизированных вакциной Энцепур®, определялся слабый иммунный ответ ко всем штаммам [37].

Кроме того, К. К. Орлингер с соавт. [38] показали, что вакцина ФСМЕ-ИММУН® способна обеспечивать выработку перекрестных нейтрализующих антител против штаммов гибридов, несущих поверхностные белки соответствующих подтипов ВКЭ (штаммов дальневосточного подтипа ВКЭ (Софьин-НО, Ошима 5-10), европейского подтипа (Найдорфл, К23), сибирского подтипа (Васильченко) и вируса омской геморрагической лихорадки (ВОГЛ GenBank AF069066)), встроенных в капсид вируса лихорадки Западного Нила (штамм NY99-фламинго 382-99 ВЛЗН «дикого» типа). Было установлено, что у 100% привитых лиц 3-кратно вакциной ФСМЕ-ИММУН® вырабатываются специфические антитела против трех штаммов гибридов, при этом среднегеометрический титр (СГТ) в РН в отношении всех штаммов составлял от 1:224 до 1:409, а в отношении штамма гибрида ВОГЛ — у 98% (СГТ 1:133). Аналогичные экспериментальные исследования европейских вакцин были проведены N. N. Chidumayo с соавт. относительно штамма Софьин-НО ВКЭ и штамма Гурьев ВОГЛ [39]. Авторы показали, что европейские вакцины (Епсериг®, FSME-IMMUN®) при комбинированной вакцинации в эксперименте с использованием лабораторных животных (мыши) и образцов сывороток крови людей способны обеспечивать выработку нейтрализующих антител к ВКЭ и ВОГЛ. При этом отмечается, что у 2-кратно привитых нейтрализующие антитела (в РН) против ВКЭ и ВОГЛ выявляются у 87 и 79% лиц соответственно (СГТ в РН 1:83 и 1:100

¹⁰ СП 3.1.3.2352-08 Профилактика клещевого вирусного энцефалита (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 07.03.2008 № 19).

¹¹ Лучинина СВ. Особенности иммунитета к вирусу клещевого энцефалита у населения в природном очаге на Южном Урале: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск; 2015.

¹² Эпидемиологическая ситуация и прогноз заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом в Российской Федерации на 2012 год. Роспотребнадзор. <http://77.rospotrebнадzor.ru/index.php/san-epid/52-infec/804-encefalit>

¹³ Минимальная иммунизирующая доза вакцины, защищающая 50% мышей при заражении ВКЭ.

соответственно), среди 3-кратно привитых — 100 и 86% соответственно (СГТ в РН 1:819 и 1:1015). У привитых 2-кратно только вакциной FSME-IMMUN® нейтрализующие антитела против ВКЭ выявляются у 71% особей в РН, а против ВОГЛ — у 57%. Статистически значимые различия в уровнях СГТ в разных опытах отсутствовали. Л. Л. Чернохаева с соавт. отмечают, что в отношении 14 штаммов всех генетических подтипов ВКЭ у мышей, привитых 3-кратно Вакциной клещевого энцефалита культуральной очищенной концентрированной инактивированной сухой (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН»), вырабатывается иммунный ответ с защитным уровнем антител (1:40 и выше в РН) также против штамма Никитин ВОГЛ (1:20–1:70 в РН) и штамма Повассан 24 вируса Повассан, однако уровень антител к штамму Повассан 24 был ниже защитного титра (1:8 в РН) [40]. Дополнительные исследования защитной эффективности вакцины показали, что 86–100% иммунизированных 2-кратно мышей были защищены от штаммов ВОГЛ и Повассан (дозы вирусов 100–5000 ЛД₅₀), от максимальной дозы (4000 ЛД₅₀) штаммов дальневосточного подтипа ВКЭ (штамм ДВ-936к) и сибирского подтипа (Лесопарк, ЕК-328) было защищено 85% мышей. Авторы отмечают, что вакцинация против КЭ защитила животных от смерти, но не от болезни [40], так как у мышей были выявлены клинические признаки КЭ.

По мнению В. В. Погодиной с соавт. для подтверждения эффективности вакцинных препаратов против КЭ в эксперименте необходимо использовать современные штаммы ВКЭ, выделенные от умерших пациентов с тяжелой формой КЭ [15].

Несмотря на выявленную эффективность всех вакцин против штаммов ВКЭ трех подтипов, в России (Курганская область) в 2010 г. был зафиксирован случай заболевания, заслуживающий пристального внимания исследователей. Пациент ранее был многократно иммунизирован вакцинами КЭ (4 прививки вакциной «НПО «Вирион», 1 — вакциной Энцевир®, 1 — Вакциной клещевого энцефалита культуральной очищенной концентрированной инактивированной сухой (в период 1998–2008 г.)), однако заболевание закончилось летально, посмертно из тканей головного мозга пациента был выделен штамм ВКЭ сибирского подтипа [30].

Иммунологическая эффективность специфической профилактики клещевого энцефалита

Главным критерием эффективности вакцин является способность вакцинированного организма индуцировать устойчивый протективный уровень специфических антител, нейтрализующих ВКЭ.

Согласно инструкциям по медицинскому применению на вакцины против КЭ российского и европейского производства, полный курс вакцинации состоит из 2 прививок (V1–V2) и одной ревакцинации (RV1), затем отдаленные RV проводятся каждые 3 года. Ускоренная схема вакцинации проводится с интервалом 2 недели между прививками V1–V2.

В период кампании массовой вакцинации населения Свердловской области было установлено, что у привитых, получивших полный курс специфической профилактики с использованием Вакцины клещевого энцефалита культуральной очищенной концентрированной инактивированной сухой (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН»), антитела выявлялись у 99,1 ± 0,9% лиц с преобладанием титров антител 1:3200 в ИФА (51 ± 4,6%), у привитых препаратом Энцевир® специфические антитела

выявлялись у 98 ± 1,6% лиц с преобладанием титров антител 1:1600 в ИФА (46,8 ± 5,8%), у вакцинированных ФСМЕ-ИММУН® специфические антитела выявлялись у 96,4 ± 1,7% лиц с преобладанием титра антител 1:1600 в ИФА (41,1 ± 4,5%), у привитых вакциной Энцепур® число серопозитивных лиц составляло 95 ± 2% с преобладанием титров антител 1:1600 в ИФА (52 ± 4,6%) [27]. Таким образом, у 41–52% лиц, прошедших полный курс вакцинации, вырабатываются специфические антитела с максимальными титрами от 1:1600 до 1:3200 (в ИФА).

По данным А. С. Килияной¹⁴, у 97% лиц, привитых против КЭ вакцинами российского и европейского производств, после завершения курса вакцинаций вырабатывается специфический иммунитет на уровне 1:100–1:6400 по результатам ИФА. При этом у 73,4% лиц выявлялись антитела в титре 1:1600–1:6400, у 23,3% — 1:400–1:800, у 3,3% — 1:100–1:200.

Данные устойчивости специфических антител через 1 и 2 года после последней вакцинации у привитых 3-кратно вакцинами российского и европейского производств представлены в таблице 1 [41].

В том числе при комбинированной вакцинации у привитых лиц специфические антитела выявляются у 100 и 92,7% соответственно [41].

По данным М. С. Воробьевой с соавт. [42], у лиц, привитых по ускоренной схеме (экспресс-иммунизация) вакциной КЭ Энцевир®, через 14 сут после первой вакцинации (V1) специфические антитела IgG, по данным результатов ИФА, выявлялись у 56% привитых лиц, у привитых вакциной ФСМЕ-ИММУН® антитела выявлялись у 50% лиц; через 14 и 30 сут после второй прививки (V2) вакциной Энцевир® антитела IgG выявлялись (на обоих сроках) у 100% привитых, у привитых вакциной ФСМЕ-ИММУН® — 94 и 96% случаев соответственно. По данным М. Ф. Ворovich с соавт., на 14 сут у 50% лиц, однократно привитых (V1) препаратами КЭ Энцевир®, Клещ-Э-Вак, специфические антитела в реакции ИФА выявляли на уровне СГТ не менее 1:240, на 14 сут после V2 90–100% привитых лиц имели антитела на уровне 1:500 (СГТ) [43]. Авторы отмечали, что статистически значимые различия в уровнях СГТ между привитыми по стандартной и ускоренной схеме отсутствуют. На этом основании авторы предлагали рассмотреть возможность изменения схемы вакцинации.

В Австрии на этапе проведения экспериментальных исследований первых серий вакцины FSME-IMMUN® было показано, что уже после трех вакцинаций число серопозитивных лиц в РТГА составляло 98%, по данным результатов реакции ИФА — 99,5% [25]. В период 1994–2001 гг. было установлено, что среди лиц, привитых 2-кратно препаратом FSME-IMMUN®, клиническая эффективность вакцинации составляла 96,4–100%, среди лиц, привитых 3-кратно, — 96–98,7%. При повторном исследовании (2000–2006 гг.) эффективность вакцинации составила 99% у лиц, получивших три и более вакцинаций¹⁵.

Среди вакцинированных жителей эндемичных регионов по КЭ выявляются нарушения официальных схем прививок, что связано с медицинскими отводами, миграцией, громоздкой схемой прививок.

Согласно СП 3.1.3.2352-08 Профилактика клещевого вирусного энцефалита¹⁶ в случае нарушения схемы вакцинации против КЭ необходимо проводить исследование состояния специфического иммунитета. При наличии у привитого за-

¹⁴ Килиянина АС. Изучение эффективности массовой вакцинации населения против клещевого энцефалита вакцинами III поколения (по материалам Свердловской области): автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.: 2008.

¹⁵ Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2011;86(24):241–56. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/241769/WER8624_241-256.PDF?sequence=1&isAllowed=y

¹⁶ СП 3.1.3.2352-08 Профилактика клещевого вирусного энцефалита (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 07.03.2008 № 19).

Таблица 1. Устойчивость специфических антител у лиц, привитых вакцинами российского и европейского производств, по данным ИФА [41]

Table 1. ELISA data on the stability of specific antibodies in persons vaccinated with Russian and European vaccines [41]

Название вакцины Vaccine	Число серопозитивных лиц через 1 год после 3 прививок, % Number of seropositive individuals 1 year following 3 vaccinations, %	Число серопозитивных лиц через 2 года после 3 прививок, % Number of seropositive individuals 2 years following 3 vaccinations, %
Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН») Tick-borne encephalitis vaccine, cultured, purified, concentrated, inactivated, dried (Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences)	100	94,1
ЭнцеВир® EnceVir®	88,2	83,9
ФСМЕ-ИММУН® FSME-IMMUN®	88,2	78,1
Энцепур® Encepur®	100	100

Таблица 2. Устойчивость специфического иммунитета у лиц, нарушивших схему вакцинации [44]

Table 2. Stability of specific immunity in individuals who violated the vaccination scheme [44]

Группа Group	Общее количество вакцинаций Total number of vaccinations	Количество пропущенных вакцинаций после основного курса прививок Number of vaccinations missed after the main round of vaccinations	Количество серонегативных лиц, % Number of seronegative individuals, %
1	3	1	19,5 ± 4,25
2	3	2–3	27,2 ± 5,5
3	4–5	1	17,0 ± 5,48
4	4–5	2–3	23,8 ± 6,57
5	6–10	1	4,8 ± 2,3
6	6–10	2–3	10,3 ± 4

Примечание. Если пропущена 1 ревакцинация, то исследование сыворотки проводилось через 5 лет после последней вакцинации, пропущено 2 ревакцинации — через 6–8 лет, пропущено 3 ревакцинации — через 9–11 лет.

Note. If 1 revaccination was missed, the serum test was performed 5 years after the last vaccination, 2 revaccinations were missed — after 6–8 years, 3 revaccinations were missed — after 9–11 years.

щитного титра антител 1:100 и выше, установленного методом ИФА, необходимо продолжить вакцинацию. В случае если у привитого отсутствуют специфические антитела, то курс вакцинации начинают заново.

Необходимо отметить, что случаи заболевания КЭ как в регионах России, так и в Европе чаще выявляются среди лиц с нарушенной и неполной схемой прививок¹⁷ [15, 16, 32, 33]. В связи с этим на высокоэндемичных по КЭ территориях необходимо проводить плановый мониторинг напряженности поствакцинального иммунитета, оценку иммунной прослойки населения. Однако в настоящее время такие работы практически не проводятся, в связи с чем по-прежнему актуальным является изучение длительности сохранения антител у привитых, особенно среди лиц, нарушивших схему вакцинации.

Г. Н. Леонова показала, что у привитых, получивших полный курс прививок вакциной Энцепур®, через 3 года после последней прививки выявляются специфические антитела на уровне от 1:400 до 1:3200 в реакции ИФА. Через 5 лет после последней вакцинации (нарушение схемы вакцинации — пропу-

щена 1 ревакцинация, т. е. 4-я прививка) титры специфических антител снижались в 2 раза [41].

Согласно данным М. С. Есюниной¹⁸, у привитых лиц против КЭ, получивших полный курс вакцинаций и нарушивших интервал между отдаленными ревакцинациями, специфический иммунитет сохраняется в течение 4–8 лет на уровне СГТ 187,1 ± 2,6 (RV1), 107,3 ± 3,4 (RV2), 104,2 ± 3,0 (RV3), 116,2 ± 3,0 (по результатам реакции ИФА). На основании полученных данных автором было предложено увеличить интервал между вакцинациями до 6 лет. Однако в настоящее время вопрос о защитной активности данного уровня антител против ВКЭ является дискуссионным.

Показано, что у лиц, привитых от 3 до 10 раз вакциной Энцепур®, нарушивших схему вакцинации, в реакции ИФА специфические антитела выявлялись в течение 9 лет с уровнем специфических антител от 1:100 до 1:800 и выше. При этом устойчивость специфических антител зависела от количества полученных прививок (табл. 2) [44].

Сохранность и напряженность иммунитета с достоверностью $P = 95\%$, выше у лиц, привитых 6–10-кратно, сравнительно с группой привитых 3-кратно [44].

¹⁷ Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2011;86(24):241–56. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/241769/WER8624_241-256.PDF?sequence=1&isAllowed=y

Волкова ЛИ. Клещевой энцефалит на Среднем Урале: клиничко-эпидемиологический анализ острых и хронических форм, пути оптимизации оказания специализированной медицинской помощи в эндемичном очаге: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Екатеринбург; 2009.

¹⁸ Есюнина МС. Современные тенденции заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом в условиях различных тактик иммунизации и усовершенствование эпидемиологического надзора и контроля: дис. ... канд. мед. наук. Пермь; 2015.

Таблица 3. Схемы вакцинации против клещевого энцефалита вакцинами европейского производства¹⁹
Table 3. Vaccination schemes for European TBE vaccines¹⁹

Названия вакцин клещевого энцефалита TBE vaccine	Первичный курс (V1–V2) Primary round (V1–V2)	Ревакцинация (RV1) Revaccination (RV1)	Отдаленные ревакцинации (RV2...) Delayed revaccination (RV2...)	Экстренная схема Emergency scheme
ФСМЕ-ИММУН® FSME-IMMUN®	Между 1 и 2 прививками интервал 1–3 месяца The interval between the 1st and 2nd vaccinations is 1–3 months	Через 9–12 месяцев после 2 прививки 9–12 months after the 2nd vaccination	Каждые 3 года Every 3 years	2 прививки с интервалами 0–14 сут, третья прививка через 9–12 месяцев 2 vaccinations at intervals of 0–14 days, and the third vaccination after 9–12 months
ЭнцеПур® Encepur®				3 прививки с интервалами 0–7–21 сут 3 vaccinations at intervals of 0–7–21 days

По данным Л. Д. Щучиновой с соавт. [45], у лиц, вакцинированных препаратами Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН») и Энцевир®, получавших регулярно вакцинацию и нарушивших схему прививок (увеличен интервал между 1 и 2 прививкой до 1 года, между 2 и 3 — до 2 лет, интервал между отдаленными ревакцинациями увеличен до 4–7 лет), число серопозитивных лиц составляло 93,5%. При этом число лиц с титрами антител в ИФА 1:100–1:200 составляло 22,8%, с титром антител выше 1:400 — 77,2%. Авторы отмечают, что уровень специфического иммунитета выше (1:400 и выше) среди 4- и 5–6-кратно привитых (95,6 и 100% соответственно) по сравнению с 2- и 3-кратно вакцинированными (43,2 и 68,5% соответственно) [45].

На производстве АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) методом ИФА проводили исследование напряженности специфического иммунитета сотрудников предприятия, привитых 3-кратно вакциной Энцевир® в течение 10 лет. Установлено, что у привитых лиц с исходными титрами антител от 1:600 до 1:12800, установленных в ИФА, через 3 года с момента последней прививки выявляются титры антител на уровне 1:200–1:1600. У лиц, не получавших вакцинацию в течение 10 лет после основного курса прививок (нарушившие схему прививок), специфические антитела в реакции ИФА выявлялись на уровне от 1:100 до 1:800. У привитых в возрасте старше 40 лет при исходных титрах 1:400 через 1 и 4 года после 3-й прививки антитела не выявлялись. Ревакцинацию проводили только при уровне антител 1:100 или при отсутствии антител. Таким образом, авторы показали, что после трех вакцинаций (основной курс) у большинства привитых специфический иммунитет может сохраняться на протяжении 10 лет [46].

Устойчивость показателей специфического иммунного ответа изучали также ученые стран Европы [25]. В период проведения кампании массовой специфической профилактики населения Австрии было установлено, что у 3-кратно привитых лиц антитела выявлялись через 4–5 лет после последней прививки на уровне СГТ 1:20 (в РН), через 6–8 лет — 1:18–1:23 [25]. По-

вторные исследования иммуногенности вакцин FSME-IMMUN®, Encepur® children, Encepur® adults в реакции РТГА и РН показали, что у 92–100% привитых лиц вырабатываются специфические антитела после получения основного курса вакцинаций (3 прививки) по стандартной и ускоренной схемам. Заболевания КЭ привитых возникают чаще среди лиц старшего возраста с нарушенной схемой вакцинации [32]. Изучение сроков персистенции антител у привитых лиц показало, что специфические антитела сохраняются у 90% привитых на протяжении 6–8 лет после получения 3 прививок и 1 и более отдаленной ревакцинации²⁰. В таблице 3 показана схема прививок вакцинами европейского производства.

Изучение сроков персистенции антител у вакцинированных лиц позволило ученым внести изменения в традиционную схему вакцинаций. В настоящее время в Австрии и Германии отдаленные ревакцинации проводят через 5 лет после полного курса вакцинаций (3 прививки) и одной отдаленной ревакцинации лицам не старше 50 (Австрия), 60 лет (Германия). Только в Швейцарии интервал между отдаленными ревакцинациями составляет ≤10 лет²¹.

По данным Л. Д. Щучиновой с соавт. [45], через 10–34 года после последней вакцинации уровень антител у большинства привитых лиц составлял 1:100–1:200. Другими авторами было установлено, что у вакцинированных лиц после 5 прививок антитела выявляются через 11 и 15 лет в титре 1:100–1:200, после 6–7 прививок специфические антитела выявляются через 10–17 и 19 лет с титрами антител 1:100, после 8 прививок через 36 лет с титрами антител 1:100 [44].

Не менее важным фактором, влияющим на специфический иммунитет, является возраст вакцинируемых. Показано, что у лиц в возрасте 22–40 лет, получивших полный курс вакцинации препаратом Энцевир®, вырабатывается более активный и устойчивый иммунитет после вакцинации, чем у лиц старшего возраста — 40–50 лет [46]. Установлено, что у лиц старшего возраста, получивших полный курс вакцинаций и нарушивших схему ревакцинаций, титры антител вырабатываются на более низком уровне [45]. Аналогичные результаты по влиянию воз-

¹⁹ Kollaritsch H, Krasilnikov V, Holzmann H, Karganova G, Barrett A, Süss J, et al. Background document on vaccines and vaccination against tick-borne encephalitis (TBE). https://www.who.int/immunization/sage/6_TBE_backgr_18_Mar_net_apr_2011.pdf

²⁰ Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2011;86(24):241–56. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/241769/WER8624_241-256.PDF?sequence=1&isAllowed=y

Kollaritsch H, Krasilnikov V, Holzmann H, Karganova G, Barrett A, Süss J, et al. Background document on vaccines and vaccination against tick-borne encephalitis (TBE). https://www.who.int/immunization/sage/6_TBE_backgr_18_Mar_net_apr_2011.pdf

²¹ Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2011;86(24):241–56. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/241769/WER8624_241-256.PDF?sequence=1&isAllowed=y

Kollaritsch H, Krasilnikov V, Holzmann H, Karganova G, Barrett A, Süss J, et al. Background document on vaccines and vaccination against tick-borne encephalitis (TBE). https://www.who.int/immunization/sage/6_TBE_backgr_18_Mar_net_apr_2011.pdf

раста, а также пола, на устойчивость и активность иммунитета получены другими авторами²² [45–48].

Таким образом, было показано, что у всех привитых лиц против КЭ вырабатывается специфический иммунитет, который постепенно снижается, что приводит к увеличению числа лиц с низкими титрами антител 1:100–1:200 или лиц, не имеющих специфические антитела (серонегативные). В связи с этим важным является оценка протективной активности титров специфических антител.

Протективная эффективность специфических антител против вируса клещевого энцефалита

Изучение защитного уровня специфических антител у населения, проживающего в высокоэндемичных регионах по КЭ, является важным, прежде всего, для понимания причин заболеваемости КЭ среди привитых, а также для определения тактики вакцинации.

У привитых лиц в сыворотках крови выявляются специфические антитела к ВКЭ на уровне от 1:100 до 1:800 и более. Титр антител 1:100, по данным СП 3.1.3.2352-08, является защитным²³. Оценка нейтрализующей активности титра антител 1:100 является важным фактором, так как на отдельных территориях России число лиц с таким уровнем специфического иммунитета составляет 22,1–52% [44].

На основании результатов проведенных исследований (*in vivo* и *in vitro*) показано, как происходит процесс нейтрализации ВКЭ в инфекционных дозах от 1 до 8 Ig ТЦД₅₀/мл²⁴ иммуноглобулином, содержащим специфические антитела в титрах 1:400 и 1:3200. На культуре клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ) антитела класса IgG в титре 1:400 полностью нейтрализовали инфекционную дозу вируса КЭ 3 Ig ТЦД₅₀/мл, а при титре 1:3200 — 4 Ig ТЦД₅₀/мл. Кроме того, в опыте с инфекционной дозой вируса 5 Ig и 6 Ig антитела IgG в титре 1:3200 снижали его уровень на 3–4 Ig ТЦД₅₀/мл, а с инфекционной дозой вируса 7 Ig и 8 Ig — на 1–2 Ig ТЦД₅₀/мл [41]. Дополнительно проведенные эксперименты подтвердили вывод о том, что титр антител IgG 1:400 в ИФА считается нижним порогом защитного уровня антител. Этот показатель можно использовать при оценке иммунологической эффективности вакцин, применяемых для профилактики КЭ. Титр антител 1:100 авторы считают нижним порогом иммунологической памяти [41].

Г. Н. Леоновой с соавт. [49] повторно было проведено исследование защитных свойств специфических антител против ВКЭ в различных титрах с использованием в эксперименте специфического иммуноглобулина КЭ производства АО «НПО «Микроген» и штаммов ВКЭ дальневосточного подтипа (Dalnegorsk — высоковирулентный, Primorye — слабовирулентный штаммы). Показано, что антитела с титром 1:100 не обладают защитными действиями против обоих штаммов ВКЭ, антитела с титрами 1:400 нейтрализуют только слабовирулентный штамм ВКЭ, титр антител 1:3200 нейтрализует все дозы слабо- и высоковирулентного штаммов ВКЭ [49]. Если в сыворотке крови уровень антител класса IgG составляет 1:400 и ниже, следует рекомендовать продолжить курс вакцинации. У лиц, получивших курс специфической вакцинации против ВКЭ

и имеющих титр антител 1:800 и выше, очередную ревакцинацию можно перенести на следующий год. В предэпидемический сезон у этих лиц первоначально рекомендуется исследовать кровь на напряженность иммунитета к вирусу КЭ с тем, чтобы принять правильное решение о сроках ревакцинации.

По данным В. В. Погодиной с соавт. [50], титр антител 1:100, установленный методом ИФА, обладал «слабой нейтрализующей активностью» (нейтрализация до 1,0 Ig индекса нейтрализации (ИН)²⁵) против штамма Челябинск-Абд-2012 сибирского подтипа ВКЭ. При титре антител 1:200 происходила нейтрализация ВКЭ от 1,7 до 1,9 Ig ИН, 1:400 — 2,0–2,9 Ig ИН, 1:1600–1:6400 — 3,0–4,0 Ig ИН. Авторы рекомендовали отсрочить вакцинацию при уровне специфического иммунитета в ИФА от 1:800 до 1:6400 [50].

Максимальный титр специфических антител, который определяется у привитого против КЭ населения Свердловской и Курганской областей, составляет 1:6400²⁶ [44]. Уровень специфических антител выше 1:6400 встречался только среди вакцинированных пациентов с диагнозом КЭ [51, 52]. Нейтрализующая активность антител в титре 1:6400 (по данным ИФА) в опыте с использованием лабораторных животных (BALB/c) показал, что антитела с таким уровнем способны нейтрализовать штамм ВКЭ Софьин дальневосточного подтипа в дозе до 6,0 Ig ЛД₅₀, штамм сибирского подтипа Айна в дозе 5,0 Ig ЛД₅₀. В эксперименте с использованием культуры клеток СПЭВ титр антител 1:6400 нейтрализовал штамм сибирского подтипа Челябинск-Абд-2012 в дозе 4,0 Ig ИН. Более высокие дозы ВКЭ данный уровень антител не способен нейтрализовать. То есть чем выше титр специфических антител, тем более высокие дозы вируса ВКЭ он способен нейтрализовать [44]. В период проведения масштабной специфической профилактики КЭ населения Свердловской, Курганской областей у привитых выявлялся максимальный уровень антител в титрах 1:6400 (по данным ИФА). Как было установлено, титры специфических антител постепенно снижаются²⁷ [44]. Для поддержания защитного уровня специфических антител требуется проведение ревакцинаций согласно медицинским инструкциям на вакцины против КЭ. Однако по данным Н. В. Медунцына с соавт. [53] при исходных высоких титрах антител повторная иммунизация (гипериммунизация) может привести к негативному эффекту, т. е. снижению специфических антител до низких концентраций (титров), которые могут способствовать развитию феномена антителозависимого усиления инфекции.

Данный эффект был проверен на группе лиц с числом прививок 11–13 (9–11 отдаленных ревакцинаций). Среди всех обследованных лиц только один был серонегативным, т. е. устойчивость иммунитета была установлена с достоверностью $P = 95\%$. Феномен антителозависимого усиления инфекции (ADE) также связан с частыми контактами вакцинированных лиц с антигеном в природных очагах. Так, в работах А. Н. Миронова с соавт. [54] была предложена оценка возможности развития феномена ADE у вакцинированных на этапе проведения клинических исследований вакцин. Значение данного феномена в иммунитете против КЭ до конца не изучено.

²² Там же.

²³ СП 3.1.3.2352-08 Профилактика клещевого вирусного энцефалита (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 07.03.2008 № 19).

²⁴ Тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя.

²⁵ Индекс нейтрализации (ИН) — отношение титра вируса в контроле к титру вируса в опыте.

²⁶ Киячина АС. Изучение эффективности массовой вакцинации населения против клещевого энцефалита вакцинами III поколения (по материалам Свердловской области): автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.: 2008.

²⁷ Там же.

Заключение

Вакцинопрофилактика современными препаратами против ВКЭ является единственным эффективным способом защиты от КЭ, что было установлено в экспериментальных исследованиях и прежде всего в реальных условиях. Вакцинопрофилактика КЭ в полевых условиях демонстрирует высокую эффективность различных вакцин при соответствии/несоответствии природных и вакцинных штаммов при условии охвата вакцинацией не менее 80% населения.

Экспериментальные исследования по изучению эффективности вакцин против КЭ позволили установить, что все вакцины способствуют выработке протективных антител, которые циркулируют в течение длительного периода в вакцинированном организме, а также способны защитить от ВКЭ различных генетических подтипов. Однако достоверные данные, доказывающие большую или меньшую эффективность разных вакцин против ВКЭ, отсутствуют. Исследования устойчивости и активности специфического иммунитета позволило определить факторы, влияющие на протективную эффективность вакцинации против различных генетических подтипов КЭ. На эффективность специфической профилактики оказывает влияние число полученных прививок (должно быть не менее 4–8), нарушение официальных схем вакцинаций, возраст и пол привитых. Необходимо отметить, что по-прежнему отсутствуют четкие данные о числе вакцинаций, необходимых для создания устойчивого протективного уровня антител, недостаточно данных о протективной активности конкретных значений титров антител против ВКЭ. В связи с этим данные исследования по-прежнему остаются актуальными, прежде всего для разработки оптимальной тактики вакцинации, а также понимания причин заболеваемости среди лиц, вакцинированных против КЭ.

Вклад авторов. М. С. Щербинина — разработка дизайна статьи, обработка и анализ материалов для статьи, написание текста статьи; О. А. Бархалева — сбор материала для статьи, редактирование статьи; О. С. Дорохова — сбор материалов для статьи; А. А. Мовсесянц — редактирование статьи, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. Mariya S. Shcherbinina—elaboration of the paper design, processing and analysis of materials for the paper, writing the paper; Oksana A. Barkhaleva—sourcing materials for the paper, editing the paper; Olga S. Dorokhova—sourcing materials for the paper; Artashes A. Movsesyants—editing the paper, 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).

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).

Конфликт интересов. А. А. Мовсесянц является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Artashes A. Movsesyants is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Коренберг ЭИ, Помелова ВГ, Осин НС. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М.: Наука; 2013. [Korenberg EI, Pomelova VG, Osin NS. Infections with natural focality transmitted by ixodid ticks. Moscow: Nauka; 2013 (In Russ.)]
2. Хафизова ИФ, Фазылов ВХ, Якупов ЭЗ, Матвеева ТВ, Хакимова АР, Муллаянова РФ. Хроническая форма клещевого энцефалита: особенности клиники и диагностики (обзор литературы). *Вестник современной клинической медицины*. 2013;6(3):79–85. [Khafizova IF, Fazylov VKh, Yakupov EZ, Matveeva TV, Khakimova AR, Mullaianova RF. Chronic tick-borne encephalitis: the clinical and diagnostics features (literature review). *Vestnik sovremennoi klinicheskoi mediciny = The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*. 2013;6(3):79–85 (In Russ.)]
3. Носков АК, Андаев ЕИ, Никитин АЯ, Пакскина НД, Яценко ЕВ, Веригина ЕВ и др. Заболеваемость клещевым вирусным энцефалитом в субъектах Российской Федерации. Сообщение 1: Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в 2018 г. и прогноз на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(1):74–80. [Noskov AK, Andaev EI, Nikitin AY, Pakskina ND, Yatsmenko EV, Verigina EV, et al. Tick-borne viral encephalitis morbidity rates in the constituent entities of the Russian Federation. Communication 1: Epidemiological situation on tick-borne viral encephalitis in 2018 and forecast for 2019. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(1):74–80 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-1-74-80>
4. Плетнев АГ, Ямщиков ВФ, Блинов ВМ. Нуклеотидная последовательность генома и полная аминокислотная последовательность полипротеина вируса клещевого энцефалита. *Биоорганическая химия*. 1989;15(11):1504–21. [Pletnev AG, Yamshchikov VF, Blinov VM. Nucleotide sequence of the genome and the complete amino acid sequence of the polyprotein of the tick-borne encephalitis virus. *Bioorganicheskaya khimiya = Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 1989;15(11):1504–21 (In Russ.)]
5. Сафронов ПФ, Нетесов СВ, Микрюкова ТП. Нуклеотидная последовательность генов и полная аминокислотная последовательность вируса клещевого энцефалита штамма 205. *Молекулярная генетика, микробиология, вирусология*. 1991;(4):23–9. [Safronov PF, Netesov SV, Mikryukova TP. Nucleotide sequence of genes and complete amino acid sequence of tick-borne encephalitis virus strain 205. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya, virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology, Virology*. 1991;(4):23–9 (In Russ.)]
6. Mandl CW, Guirakhoo F, Holzmann H, Heinz FX, Kunz C. Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. *J Virol*. 1989;63(2):564–71.
7. Злобин ВИ, Беликов СИ, Джиоев ЮП, Демина ТВ, Козлова ИВ. *Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита*. Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН; 2003. [Zlobin VI, Belikov SI, Dzhiyev YuP, Demina TV, Kozlova IV. *Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis*. Irkutsk: RIO VSNTs SO RAMN; 2003 (In Russ.)]
8. Dobler G, Tkachev S. General epidemiology of TBE. In: Dobler G, Erber W, Schmitt H-J, eds. *Tick-borne Encephalitis (TBE). The TBE Book*. Singapore: Global Health Press Pte Ltd; 2018. P. 103–13.
9. Злобин ВИ, Верхозина ММ, Демина ТВ, Джиоев ЮП, Адельшин РВ, Козлова ИВ и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2007;52(6):4–13. [Zlobin VI, Verkhosina MM, Demina TV, Dzhiyev YuP, Adelshin RV, Kozlova IV, et al. Molecular epidemiology of tick borne encephalitis. *Voprosy virusologii =*

- Problems of Virology, Russian Journal.* 2007;52(6):4–13 (In Russ.)]
10. Козлова ИВ, Верхозина ММ, Демина ТВ, Джигоев ЮП, Ткачев СЕ, Карань ЛС и др. Генетические и биологические свойства оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, циркулирующей в Восточной Сибири. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2012;3(64):14–25. [Kozlova IV, Verhozina MM, Demina TV, Dzhigoev YuP, Tkachev SE, Karan LS, et al. Genetic and biological properties of the original group of tick-borne encephalitis virus strains circulating in Eastern Siberia. *Epidemiologia i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2012;3(64):14–25 (In Russ.)]
 11. Леонова ГН, Беликов СИ. Филогенетический анализ и распространение вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа (*Flaviviridae, Flavivirus, TBEV-FE*) на территории Азии. *Вопросы вирусологии.* 2019;64(5):250–6. [Leonova GN, Belikov SI. Phylogenetic analysis and distribution of Far Eastern tick-borne encephalitis virus subtype (*Flaviviridae, Flavivirus, TBEV-FE*) from Asia. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, Russian Journal.* 2019;64(5):250–6 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-250-256>
 12. Козлова ИВ, Демина ТВ, Ткачев СЕ, Савинова ЮС, Дорошенко ЕК, Лисак ОВ и др. Характеристика вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, циркулирующего на территории Сибири. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2016;15(6):30–40. [Kozlova IV, Demina TV, Tkachev SE, Savinova YuS, Doroshchenko EK, Lisak OV, et al. The characterization of TBEV of European subtype circulating in Siberia. *Epidemiologia i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2016;15(6):30–40 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-6-30-40>
 13. Герасимов СГ, Смирнов ЛВ, Разумовский СЛ, Дружинина ТА, Троицкий ВИ. Эпидемическая ситуация по клещевому энцефалиту в регионах Центрального федерального округа России. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2019;8(4):17–23. [Gerasimov SG, Smirnov LV, Razumovskiy SL, Druzhinina TA, Troitskiy VI. Epidemic situation on tick-borne encephalitis in regions of Central Federal District of Russia. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye = Infectious Diseases: News, Opinions, Training.* 2019;8(4):17–23 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-14002>
 14. Погодина ВВ, Карань ЛС, Колясникова НМ, Левина ЛС, Маленко ГВ, Гамова ЕГ и др. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя. *Вопросы вирусологии.* 2007;52(5):16–21. [Pogodina VV, Karan LS, Kolyasnikova NM, Levina LS, Malenko GV, Gamova YeG, et al. Evolution of tick-borne encephalitis and a problem of evolution of its causative agent. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, Russian Journal.* 2007;52(5):16–21 (In Russ.)]
 15. Погодина ВВ, Щербинина МС, Герасимов СГ, Колясникова НМ. Современные проблемы специфической профилактики клещевого энцефалита. Сообщение I: Вакцинопрофилактика в зоне доминирования сибирского подтипа возбудителя. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2015;14(5):77–84. [Pogodina VV, Shcherbinina MS, Gerasimov SG, Kolyasnikova NM. Modern problems of tick-borne encephalitis specific prevention. Communication I: Vaccinal prevention in area with Siberian virus subtype domination. *Epidemiologia i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2015;14(5):77–84 (In Russ.)]
 16. Лучинина СВ, Семенов АИ, Степанова ОН, Погодина ВВ, Герасимов СГ, Щербинина МС и др. Вакцинопрофилактика клещевого энцефалита в Челябинской области: масштабы вакцинации, популяционный иммунитет, анализ случаев заболевания привитых. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2016;15(1):67–76. [Luchinina SV, Semenov AI, Stepanova ON, Pogodina VV, Gerasimov SG, Shcherbinina MS, et al. Vaccinal prevention of tick-borne encephalitis in Chelyabinsk region: dynamics of vaccination, population immunity, analysis of TBE cases in vaccinated persons. *Epidemiologia i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2016;15(1):67–76 (In Russ.)]
 17. Погодина ВВ, Карань ЛС, Левина ЛС, Колясникова НМ, Герасимов СГ, Маленко ГВ. 75-летие открытия вируса клещевого энцефалита. Сравнение ранних (1937–1945) и современных штаммов. *Вопросы вирусологии.* 2012;(S1):66–75. [Pogodina VV, Karan LS, Levina LS, Kolyasnikova NM, Gerasimov SG, Malenko GV. 75-anniversary of the tick-borne encephalitis discovery. Comparison of historical (1937–1945) and modern strains of tick-borne encephalitis virus. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, Russian Journal.* 2012;(S1):66–75 (In Russ.)]
 18. Аитов КА, Бурданова ТМ, Верхозина ММ, Демина ТВ, Джигоев ЮП, Козлова ИВ и др. Клещевой энцефалит в Восточной Сибири: этиология, молекулярная эпидемиология, особенности клинического течения. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2018;7(3):31–40. [Aitov KA, Burdanova TM, Verhozina MM, Demina TV, Dzhigoev YuP, Kozlova VI, et al. Tick-borne encephalitis in Eastern Siberia: etiology, molecular epidemiology and peculiarities of the clinical course. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye = Infectious Diseases: News, Opinions, Training.* 2018;7(3):31–40 (In Russ.)]
 19. Ефимова АР, Карань ЛС, Дроздова ОМ, Григорьева ЯЕ, Фролова НА, Шейдерова ИД и др. Современная эпидемиологическая ситуация по клещевому энцефалиту и генетическое разнообразие ВКЭ на территории Кемеровской области. *Труды института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова РАМН. Медицинская вирусология.* 2015;29(1):3–15. [Efimova AR, Karan LS, Drozdova OM, Grigorieva YeE, Frolova NA, Sheiderova ID, et al. Tick-borne encephalitis in Kemerovo region: epidemiology and genetic diversity of the virus. *Proceedings of the Institute of polio and viral encephalitis of the Academy of medical Sciences. Medical Virology.* 2015;29(1):3–15 (In Russ.)]
 20. Pöllabauer EM, Kollaritsch H. Prevention: Vaccines+immunoglobulins. In: Dobler G, Erber W, Schmitt H-J, eds. *Tick-borne Encephalitis (TBE). The TBE Book.* Singapore: Global Health Press Pte Ltd; 2018. P. 290–304.
 21. Воробьева МС, Меркулов ВА, Ладыженская ИП, Рукавишников АВ, Шевцов ВА. История создания и оценка качества современных вакцин клещевого энцефалита отечественного и зарубежного производства. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2013;(3):40–4. [Vorobieva MS, Merkulov VA, Ladyzhenskaya IP, Rukavishnikov AV, Shevtsov VA. The history and quality evaluation of tick-borne encephalitis vaccine. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2013;(3):40–4 (In Russ.)]
 22. Билалова ГП, Быстрицкий ЛД, Воробьева МС, Красильников ИВ, Ильченко ТЭ, Соляник РГ и др. История производства вакцин для профилактики клещевого энцефалита в г. Томске: от мозговой вакцины до вакцин Энцевир. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2007;27(4):105–10. [Bilalova GP, Bistritskiy LD, Vorobiova MS, Krasilnikov IV, Ilchenko TE, Solynik RG, et al. The history of vaccines production for profilactics of tick-borne encephalitis in Tomsk: from brain vaccine to EnceVir vaccine. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = The Siberian Scientific Medical Journal.* 2007;27(4):105–10 (In Russ.)]
 23. Козлова ТЮ, Хантимирова ЛМ, Рукавишников АВ, Шевцов ВА. Анализ эффективности и безопасности вакцин для профилактики клещевого энцефалита. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.*

- ние. 2018;18(1):33–41. [Kozlova TYu, Khantimirova LM, Rukavishnikov AV, Shevtsov VA. Analysis of efficacy and safety of tick-borne encephalitis vaccines. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):33–41 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-33-41>
24. Лезина МН, Воробьева МС, Воробьева РН, Верета ЛА. Штамм Viri Ixodici Encephalitis № 205 для приготовления вакцины против клещевого энцефалита. Патент СССР № 669742; 1980. [Lezina MN, Vorobyova MS, Vorobyova RN, Vereta LA. Strain Viri Ixodici Eucephalitis № 205 for preparing vaccine against tick-borne encephalitis: Patent SSSR № 669742; 1980 (In Russ.)] <https://patents.su/3-669742-shtamm-dlya-prigotovleniya-vakciny-protiv-kleshhevogo-ehncefalita.html>
25. Kunz C. TBE vaccination and the Austrian experience. *Vaccine*. 2003;21(Suppl 1):S50–5. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00813-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00813-7)
26. Носков АК, Никитин АЯ, Андаев ЕИ, Пакскина НД, Яценко ЕВ, Веригина ЕВ и др. Клещевой вирусный энцефалит в Российской Федерации: особенности эпидемического процесса в период устойчивого спада заболеваемости, эпидемиологическая ситуация в 2016 г., прогноз на 2017 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(1):37–43. [Noskov AK, Nikitin AY, Andaev EI, Paksina ND, Yatsmenko EV, Verigina EV, et al. Tick-borne virus encephalitis in the Russian Federation: features of epidemic process in steady morbidity decrease period. Epidemiological condition in 2016 and the forecast for 2017. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* = *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(1):37–43 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-1-37-43>
27. Романенко ВВ, Киячина АС, Есюнина МС, Анкудинова АВ, Пименова ТА. Эффективность программы массовой иммунопрофилактики клещевого энцефалита. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2008;(2):9–14. [Romanenko VV, Kilyachina AS, Eyunina MS, Ankudinova AV, Pimenova TA. Effectiveness of the mass immunoprophylaxis program for tick-borne encephalitis. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2008;(2):9–14 (In Russ.)]
28. Ладыгин ОВ, Быков ИП, Романенко ВВ, Чистякова ЛГ, Лучинина СВ, Степанова ОН и др. Анализ заболеваемости клещевым энцефалитом на Среднем и Южном Урале за период 2011–2015 гг. *Национальные приоритеты России*. 2016;(4):41–4. [Ladygin OV, Bykov IP, Romanenko VV, Chistyakova LG, Luchinina SN, Stepanova ON, et al. Evaluation of the tick-borne encephalitis incidence in the Middle and Southern Ural during the period of 2011–2015. *Natsional'nyye priority Rossii* = *Russia's National Priorities*. 2016;(4):41–4 (In Russ.)]
29. Погодина ВВ, Щербинина МС, Бочкова НГ, Безрукова ЕГ, Наумов ЕИ, Снигур ТА и др. Вакциноterapia хронического клещевого энцефалита. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014;19(4):30–6. [Pogodina VV, Shcherbinina MS, Bochkova NG, Bezrukova EG, Naumov EI, Snigur TA, et al. Vaccine therapy of chronic tick-borne encephalitis. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni* = *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2014;19(4):30–6 (In Russ.)]
30. Погодина ВВ, Левина ЛС, Скрынник СМ, Травина НС, Карань ЛС, Колясникова НМ и др. Клещевой энцефалит с молниеносным течением и летальным исходом у многократно вакцинированного пациента. *Вопросы вирусологии*. 2013;58(2):33–7. [Pogodina VV, Levina LS, Skrynnik SM, Travina NS, Karan LS, Kolyasnikova NM, et al. Tick-borne encephalitis with fulminant course and lethal outcome in patients after plural vaccination. *Voprosy virusologii* = *Problems of Virology, Russian Journal*. 2013;58(2):33–7 (In Russ.)]
31. Погодина ВВ, Лучинина СВ, Степанова ОН, Стенько ЕА, Горфинкель АН, Кармышева ВЯ и др. Необычный случай летального исхода клещевого энцефалита у пациента, привитого вакцинами разных генотипов (Челябинская область). *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015;20(1):56–64. [Pogodina VV, Luchinina SV, Stepanova ON, Stenko EA, Gorfinkel AN, Karmysheva VYA, et al. Unusual case of lethal tick-borne encephalitis in patient vaccinated with vaccines produced from different viruses strains (the Chelyabinsk region). *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni* = *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2015;20(1):56–64 (In Russ.)]
32. Stiasny K, Holzmann H, Heinz FX. Characteristics of antibody responses in tick-borne encephalitis vaccination breakthroughs. *Vaccine*. 2009;27(50):7021–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.069>
33. Andersson CR, Vene S, Insulander M, Lindquist L, Lundkvist A, Günther G. Vaccine failures after active immunisation against tick-borne encephalitis. *Vaccine*. 2010;28(16):2827–31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.02.001>
34. Морозова ОВ, Бахвалова ВН, Потапова ОФ, Гришечкин АЕ, Исаева ЕИ. Анализ соответствия четырех вакцинных штаммов современным изолятам вируса клещевого энцефалита сибирского типа. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012;(5):67–75. [Morozova OV, Bakhvalova VN, Potapova OF, Grishchkin AE, Isaeva EI. Analysis of adequacy of the four vaccines with modern tick-borne encephalitis virus isolates of the Siberian type. *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika* = *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2012;(5):67–75 (In Russ.)]
35. Майкова ГБ, Чернохаева ЛЛ, Ворович МФ, Рогова ЮВ, Карганова ГГ. Вакцины на основе дальневосточного и европейского штаммов индуцируют нейтрализующие антитела ко всем известным подтипам вируса клещевого подтипа. *Вопросы вирусологии*. 2016;61(3):135–9. [Maikova GB, Chernokhaeva LL, Vorovitch MF, Rogova YuV, Karganova GG. Vaccines based on the Far-Eastern and European strains induce the neutralizing antibodies against all known tick-borne encephalitis virus subtypes. *Voprosy virusologii* = *Problems of Virology, Russian Journal*. 2016;61(3):135–9 (In Russ.)]
36. Афонина ОС, Бархалева ОА, Саркисян КА, Воробьева МС, Олефир ЮВ, Пирожков АП и др. Изучение защитных свойств вакцин против вирулентных штаммов вируса клещевого энцефалита трех генотипов: европейского, дальневосточного и сибирского (экспериментальное исследование). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017;16(1):62–7. [Afonina OS, Barkhaleva OA, Sarkisyan KA, Vorobieva MS, Olefir YuV, Pirozhkov AP, et al. The study of protective properties of vaccines against virulent strains of the virus tick-borne encephalitis three genotypes: European, Far Eastern and Siberian (experimental research). *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika* = *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2017;16(1):62–7 (In Russ.)]
37. Афонина ОС, Терехина ЛЛ, Бархалева ОА, Ладыженская ИП, Саркисян КА, Воробьева МС и др. Экспериментальное изучение перекрестного иммунного ответа на антигены штаммов вируса клещевого энцефалита разных генотипов у мышей BALB/c, иммунизированных различными вариантами вакцины клещевого энцефалита. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014;(5):88–96. [Afonina OS, Terekhina LL, Barkhaleva OA, Ladyzhenskaya IP, Sarkisyan KA, Vorobieva MS, et al. Experimental studies cross immune response to antigens of the virus strains of tick-borne encephalitis different genotypes in BALB/c mice, immunized with various embodiments of tick-borne encephalitis vaccine. *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika* = *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2014;(5):88–96 (In Russ.)]
38. Орлингер КК, Хофмейстер И, Фритц Р, Холцер ГУ, Фолкнер ФГ, Унгер Б и др. Вакцина против вируса клещевого энцефалита на основе европейского прототипного

- штамма индуцирует у человека продукцию широкого спектра нейтрализующих антител с перекрестной реактивностью. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2011;5(60):39–48. [Orlinger KK, Hofmeister Y, Fritz R, Holzer GW, Falkner FG, Unger B, et al. A tick-borne encephalitis virus vaccine based on the European prototype strain induces broadly reactive cross-neutralizing antibodies in humans. *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2011;5(60):39–48 (In Russ.)]
39. Chidumayo NN, Yoshii K, Kariwa H. Evaluation of the European tick-borne encephalitis vaccine against Omsk hemorrhagic fever virus. *Microbiol Immunol*. 2014;58(2):112–8. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12122>
40. Chernokhaeva LL, Rogova YuV, Vorovitch MF, Romanova Llu, Kozlovskaya LI., Maikova GB, et al. Protective immunity spectrum induced by immunization with a vaccine from the TBEV strain Sofjin. *Vaccine*. 2016;34(20):2354–61. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.041>
41. Леонова ГН. Вакцинопрофилактика клещевого энцефалита в прошлом, настоящем и будущем. *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2011;31(4):79–85. [Leonova GN. Vaccinal prevention of tick-borne encephalitis in the past, present and future. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2011;31(4):79–85 (In Russ.)]
42. Воробьева МС, Ладыженская ИП, Бархалева ОА, Ставицкая НХ, Соляник РГ, Шкуратова ОВ. Иммунный ответ при экспресс-иммунизации против клещевого энцефалита вакцинами Энцевир (Россия) и ФСМЕ-Иммун (Австрия). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2009;(5):61–5. [Vorobjeva MS, Ladizhenskaja LP, Barkhaleva OA, Stavickaja NH, Soljanik RG, Shkuratova OV. Immune response during rapid immunization against tick-borne encephalitis vaccine Encevir (Russia) and FSME-Immune (Austria). *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2009;(5):61–5 (In Russ.)]
43. Ворович МФ, Майкова ГБ, Чернохаева ЛЛ, Романенко ВВ, Анкудинова АВ, Хапчаев ЮХ и др. Иммунологическая эффективность и безопасность вакцины «Клещ-Э-Вак»: «взрослая» форма. *Вопросы вирусологии*. 2017;62(2):73–80. [Vorovitch MF, Maikova GB, Chernokhaeva LL, Romanenko VV, Ankudinova AV, Khapchaev YuKh, et al. Immunogenicity and safety of the adult TBE vaccine «Tick-E-Vac». *Voprosy virusologii = Problems of Virology, Russian Journal*. 2017;62(2):73–80 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-73-80>
44. Щербинина МС, Скрынник СМ, Левина ЛС, Герасимов СГ, Бочкова НГ, Лисенков АН и др. Состояние поствакцинального иммунитета к вирусу клещевого энцефалита у населения высокоэндемичной территории в условиях доминирования сибирского подтипа возбудителя. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018;17(2):27–36. [Shcherbinina MS, Skrynnik SM, Levina LS, Bochkova NG, Gerasimov SG, Lisenkov AN, et al. The condition of post-vaccination immunity to the tick-borne encephalitis virus in the population highly endemic area with Siberian subtype domination. *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2018;17(2):27–36 (In Russ.)] <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-2-27-36>
45. Щучинова ЛД, Щучинов ЛВ, Злобин ВИ. Анализ факторов, оказывающих влияние на эффективность вакцинации против клещевого энцефалита. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(2):72–6. [Shchuchinova LD, Shchuchinov LV, Zlobin VI. The analysis of the factors determining efficiency of vaccination against tick-borne encephalitis. *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(2):72–6 (In Russ.)]
46. Топычанова НГ, Кувшинова ИН, Офицеров ВИ. К вопросу о сроках ревакцинации против клещевого энцефалита. *Новости «Вектор-Бест»*. 2015;2(76):3–6. [Topychkanova NG, Kuvshinova IN, Officerov VI. On the question of the timing of revaccination against tick-borne encephalitis. *Novosti «Vektor-Best» = News «Vector-Best»*. 2015;2(76):3–6 (In Russ.)]
47. Lindblom P, Wilhelmsson P, Fryland L, Matussek A, Haglund M, Sjöwall J, et al. Factors determining immunological response to vaccination against tick-borne encephalitis virus in older individuals. *PLoS One*. 2014;9(6):e100860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100860>
48. Леонова ГН, Павленко ЕВ, Крылова НВ, Майстровская ОС, Ковальчук НВ. Зависимость специфического иммунного ответа от возраста и пола у лиц, привитых вакциной против клещевого энцефалита. *Медицинская иммунология*. 2006;8(1):73–80. [Leonova GN, Pavlenko EV, Krylova NV, Maistrovskaya OS, Kovalchuk NV. Age- and sex dependence of specific immune response in the persons inoculated with tick-borne encephalitis vaccine. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology*. 2006;8(1):73–80 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2006-1-73-80>
49. Леонова ГН, Лубова ВА, Калинин АВ. Значение уровня концентрации специфических антител в элиминации разных штаммов вируса клещевого энцефалита. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017;16(2):50–4. [Leonova GN, Lubova VA, Kalinin AV. The value of the effect of the level of specific antibodies on elimination different tick-borne encephalitis virus strains. *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2017;16(2):50–4 (In Russ.)]
50. Погодина ВВ, Щербинина МС, Левина ЛС, Бочкова НГ. Изучение защитного титра антител против сибирского подтипа вируса клещевого энцефалита у вакцинированного населения. Материалы Российской научной конференции, посвященной 80-летию открытия вируса клещевого энцефалита, «Клещевой энцефалит и другие переносимые клещами инфекции». В кн.: *Труды Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН. Медицинская вирусология*. М.; 2017. С. 39. [Pogodina BB, Shcherbinina MS, Levina LS, Bochkova NG. Study of the protective titer of antibodies against the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus in the vaccinated population. Materials of the Russian scientific conference dedicated to the 80th anniversary of the discovery of tick-borne encephalitis virus, «Tick-borne encephalitis and other tick-borne infections». In: *Proceedings of the Institute of polio and viral encephalitis of the Academy of medical Sciences. Medical Virology. Medical virology*. Moscow. 2017, P. 39 (In Russ.)]
51. Лучинина СВ, Семенов АИ, Степанова ОН, Погодина ВВ, Герасимов СГ, Щербинина МС и др. Вакцинопрофилактика клещевого энцефалита в Челябинской области: масштабы вакцинации, популяционный иммунитет, анализ случаев заболевания привитых. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(1):67–6. [Luchinina SV, Semenov AI, Stepanova ON, Pogodina VV, Gerasimov SG, Shcherbinina MS, et al. Vaccinal prevention of tick-borne encephalitis in Chelyabinsk region: dynamics of vaccination, population immunity, analysis of TBE cases in vaccinated persons. *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(1):67–6 (In Russ.)]
52. Субботин АВ, Семенов ВА, Смирнов ВД, Щербинина МС, Погодина ВВ. Случай развития хронического клещевого энцефалита у вакцинированного пациента. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014;(3):104–9. [Subbotin AV, Semenov VA, Smirnov VD, Shcherbinina MS, Pogodina VV. A case of chronic tick-borne encephalitis in vaccinated person. *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2014;(3):104–9 (In Russ.)]
53. Медуницын НВ, Миронов АН. Вакцины. Новые способы повышения эффективности и безопасности вакцинации.

Вопросы вирусологии. 2012;(S1):43–51. [Medunitsyn NV, Mironov AN. Vaccines. New approaches for the enhancement of vaccination efficiency and safety. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, Russian Journal*. 2012;(S1):43–51 (In Russ.)]

54. Миронов АН, Супотницкий МВ, Лебединская ЕВ. Феномен антитело-зависимого усиления инфекции у вак-

цинированных и переболевших. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2013;(3):12–25. [Mironov AN, Supotnitskiy MV, Lebedinskaya EV. The phenomenon of antibody-dependent enhancement of infection in vaccinated and convalescents. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2013;(3):12–25 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Щербинина Мария Сергеевна, канд. мед. наук. *Mariya S. Shcherbinina*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-0895-4306>

Бархалева Оксана Александровна, канд. мед. наук. *Oksana A. Barkhaleva*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-2397-8154>

Дорохова Ольга Сергеевна. *Olga S. Dorokhova*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2247-6539>

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф. *Artashes A. Movsesyants*. Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Поступила 26.03.2020

После доработки 10.06.2020

Принята к публикации 28.08.2020

Received 26 March 2020

Revised 10 June 2020

Accepted 28 August 2020

Стабильность отраслевого стандартного образца вакцины туберкулезной (БЦЖ)

Н. В. Александрова, А. А. Савина, А. В. Наконечная, Д. Т. Леви*

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

Стандартный образец вакцины туберкулезной (БЦЖ), аттестованный и зарегистрированный в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (ОСО 42-28-420), используют в качестве препарата сравнения при контроле вакцины туберкулезной БЦЖ и БЦЖ-М. Стабильность свойств ОСО позволяет минимизировать ошибки при оценке показателей качества этих лекарственных средств, что и определяет целесообразность его применения. Срок годности ОСО вакцины БЦЖ не более 2 лет в условиях хранения образцов при температуре от 2 до 8 °С. Представляется целесообразным использование в качестве ОСО одной и той же серии в течение более длительного времени. В литературе имеются данные о возможности увеличения срока годности вакцины БЦЖ при хранении препарата при низких температурах. Однако в связи со значительными фенотипическими и генотипическими различиями между субштаммами БЦЖ эти данные не могут быть экстраполированы на вакцину из российского субштамма *Mycobacterium bovis* BCG-I без проведения соответствующих испытаний. **Цель работы:** изучение возможности увеличения срока годности отраслевого стандартного образца вакцины туберкулезной за счет изменения условий температурного режима его хранения. **Материалы и методы:** изучение влияния низких значений температуры на стабильность ОСО 42-28-420 было проведено на производственных сериях вакцины туберкулезной, которые по всем параметрам соответствовали качеству вакцин — кандидатов в ОСО. Образцы 6 серий ОСО, приготовленных с 2014 по 2019 г. включительно, хранили при температуре минус (20 ± 1) °С, проводя мониторинг стабильности их качества по показателям «Специфическая активность (жизнеспособность)», «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность» в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Результаты оценивали относительно базовых, полученных при аттестации каждой серии. **Результаты:** установлено, что при хранении ОСО 42-28-420 в течение 5 лет в условиях низких значений температуры исследуемые показатели с вероятностью более 95% не отличались от исходных. **Выводы:** полученные результаты являются основанием для увеличения срока годности ОСО 42-28-420 до 4 лет в регламентируемых условиях хранения при температуре минус (20 ± 1) °С.

Ключевые слова: ОСО вакцины БЦЖ; стабильность ОСО; срок годности; аттестуемые показатели; международные стандартные образцы

Для цитирования: Александрова НВ, Савина АА, Наконечная АВ, Леви ДТ. Стабильность отраслевого стандартного образца вакцины туберкулезной (БЦЖ). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(3):187–192. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-187-192>

Контактное лицо: Леви Диана Тимофеевна; Levi@expmed.ru

Stability of the Industrial Reference Standard of Tuberculosis Vaccine (BCG)

N. V. Aleksandrova, A. A. Savina, A. V. Nakonechnaya, D. T. Levi*

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

The industrial reference standard of tuberculosis (BCG) vaccine (IRS), certified and registered by the Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation (OSO 42-28-420), is used as a reference product in quality control of tuberculosis vaccines BCG and BCG-M. The IRS is a useful means of quality control of these products, as the stability of its properties helps to minimise errors during quality evaluation. The shelf life of the BCG vaccine IRS is not more than 2 years if stored at 2–8 °C. It is likely that a vaccine batch could be used as the IRS for a longer period of time. The literature data suggest that the shelf life of a BCG vaccine can be prolonged if it is stored at low temperatures. However, due to significant phenotypic and genotypic differences between BCG sub-strains, the extrapolation of these data to the vaccine produced from the Russian *Mycobacterium bovis* BCG-I sub-strain requires appropriate testing. **The aim of the study** was to analyse the possibility of increasing the shelf life of the tuberculosis vaccine IRS by changing the storage temperature. **Materials and methods:** the effect of low temperatures on the stability of OSO 42-28-420 was studied in commercial batches of tuberculosis vaccine which met all the quality requirements for candidate IRSs. Samples from 6 IRS batches produced from 2014 through 2019 were stored at $-(20 \pm 1)$ °C. The stability of their quality characteristics, namely "Specific activity (viability)", "Total bacterial count", and "Dispersibility", was monitored according to the recommendations of the World Health Organization. The obtained data were evaluated relative to the baseline data obtained during certification of each batch. **Results:** it was demonstrated that there was more than 95 percent probability that the tested parameters would not differ from the initial data if OSO 42-28-420 samples were stored at a low temperature for 5 years. **Conclusions:** the

results obtained support the prolongation of the OSO 42-28-420 shelf life up to 4 years under the recommended storage conditions at $-(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Key words: BCG vaccine IRS; IRS stability; shelf life; certified characteristics; international reference standards

For citation: Aleksandrova NV, Savina AA, Nakonechnaya AV, Levi DT. Stability of the industrial reference standard of tuberculosis vaccine (BCG). *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(3):187–192. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-187-192>

Corresponding author: Diana T. Levi; Levi@expmed.ru

В настоящее время применение стандартных образцов и стандартных материалов является обязательным для многих процедур при контроле качества иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП). Основными (первичными) стандартами, которые применяют во всем мире, являются международные стандартные образцы (МСО) — The First WHO International Reference Preparation. МСО утверждаются технической комиссией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). Стандартные образцы (СО), аттестованные относительно МСО, — это вторичные (региональные, государственные) стандарты.

В связи с различиями между субштаммами БЦЖ создание единого МСО для вакцин туберкулезных (БЦЖ) было и остается трудной и до настоящего времени не вполне решенной задачей. Первый Международный эталонный препарат ВОЗ (International Reference Preparation for BCG vaccine, IRP) был введен в практику контроля вакцины БЦЖ в 1965 г.¹ Однако в начале 2000-х гг. уменьшение запасов IRP до критического количества и двукратное снижение специфической активности этого стандарта потребовали его замены.

Специфическая активность туберкулезных вакцин зависит в основном от характеристики субштамма БЦЖ и технологии изготовления препарата. «Маркером» специфической активности вакцин БЦЖ является показатель жизнеспособности серии, который оценивают по количеству колоний, выросших при посеве трех разведений препарата на селективную плотную питательную среду. Данный метод оценки принято называть тестом КОЕ (колониеобразующие единицы). Этот количественный тест используют все производители вакцины и национальные контрольные лаборатории для характеристики качества препарата. Однако существующие отличия в размерах микобактериальных клеток БЦЖ, используемых при производстве вакцин из разных субштаммов, препятствуют введению единых для всех вакцин значимых нормативных показателей: «Общее содержание бактерий» и «Специфическая активность».

Для преодоления разногласий в вопросах стандартизации вакцин БЦЖ ВОЗ в 2009 г. инициировала приготовление в качестве МСО серий из трех субштаммов БЦЖ, наиболее часто используемых в мировой практике для производства туберкулезных вакцин [1]. По заказу ВОЗ в Japan BCG Laboratory были изготовлены серии вакцины из датского 1331 и японского 172-1 субштаммов БЦЖ. Серия вакцины из субштамма BCG-I Russia была приготовлена на предприятии Национального центра инфекционных и паразитарных болезней (Болгария)². Образцы всех серий-кандидатов направили в 11 лабораторий 9 стран для оценки по показателям «Специфическая активность» (по количеству жизнеспособных микобактерий БЦЖ — тест КОЕ) и «Подлинность» (молекулярно-биологическим методом).

На основании результатов международного исследования специализированная комиссия ВОЗ рекомендовала утвердить

серии из указанных субштаммов БЦЖ в качестве первичных международных эталонных реагентов (МСО) с установленным содержанием КОЕ³. В 2013 г. к этим трем МСО была присоединена серия из субштамма *Mycobacterium bovis* BCG Moreau-RJ (субштамм Моро) [2].

Содержание жизнеспособных микобактерий БЦЖ в ампуле для серии из субштамма БЦЖ (Дания) составило от 3,37 до 11,22 млн ($X = 7,29$ млн); БЦЖ-I (Россия) — от 0,95 до 5,83 млн ($X = 3,39$ млн); БЦЖ 172 (Токио, Япония) — от 29,6 до 69,14 млн ($X = 49,37$ млн) на ампулу соответственно, при расширенной неопределенности (достоверность 95%) [2]. Из-за относительно больших различий в содержании КОЕ в ампулах отдельных МСО эти референс-реагенты рекомендовано использовать не в качестве стандартов для калибровки, а в качестве препаратов сличения (компараторов) для оценки методики контроля аттестуемых показателей. МСО рекомендовано также использовать в качестве эталонов при оценке подлинности штамма-производителя методами молекулярной биологии.

Хранит и распространяет МСО Национальный институт биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC, Великобритания). Согласно рекомендации ВОЗ Национальные регуляторные органы и предприятия-изготовители разрабатывают вторичные (региональные, государственные) стандарты, используя с этой целью одну из промышленных серий препарата⁴. В качестве национального (вторичного) СО при контроле иммунобиологических лекарственных препаратов в России приняты отраслевые стандартные образцы (ОСО).

ОСО вакцины туберкулезной (БЦЖ) зарегистрирован в реестре ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России под номером ОСО 42-28-420-П. Буква «П» в номере — это год утверждения/действия ОСО. ОСО 42-28-420-П применяют в качестве препарата сравнения при контроле вакцины туберкулезной (БЦЖ/БЦЖ-М) и препаратов для иммунотерапии рака мочевого пузыря (Имурун-вак (Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря) и Уро-БЦЖ медак) по трем аттестуемым показателям качества: «Специфическая активность», «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность».

Стабильность свойств ОСО является важнейшим показателем качества, определяющим возможность его применения. Срок годности ОСО 42-28-420-П ограничен: 1 год с последующей переаттестацией еще на 1 год. Несомненно, использование СО стабильного в течение максимально длительного срока позволяет минимизировать ошибки при оценке показателей качества производственных серий вакцины, что подтверждает целесообразность применения одной и той же серии ОСО в течение длительного срока.

Цель работы — изучение возможности увеличения срока годности отраслевого стандартного образца вакцины туберкулезной за счет изменения условий температурного режима

¹ WHO Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series 329; 1966.

² WHO Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series 978; 2010.

³ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. In: WHO Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series 979; 2011. P. 137–86.

⁴ Там же.

Таблица 1. Серии ОСО, использованные при производстве и контроле вакцин БЦЖ с 2014 по 2019 г.
Table 1. IRS batches used for production and quality control of BCG vaccines from 2014 through 2019

Наименование ОСО IRS code	Номер серии ОСО (год аттестации/действия) IRS batch number (year of certification/use)	Длительность хранения, лет Storage period, years
ОСО 42-28-420-2014	14 (2014)	6
ОСО 42-28-420-2015	15 (2015)	5
ОСО 42-28-420-2016	16 (2016)	4
ОСО 42-28-420-2017	17 (2017)	3
ОСО 42-28-420-2018	18 (2018)	2
ОСО 42-28-420-2019	19 (2019)	1

Таблица 2. Алгоритм проведения испытания (рекомендованный ВОЗ)
Table 2. Test procedure (recommended by the World Health Organization)

Разведение Dilution ratio	Номер разведения Dilution number	Объем, мл Volume, mL	
		микробной взвеси microbial suspension	раствора натрия хлорида 0,9% 0.9% sodium chloride solution
1:50	1	2,0 основной взвеси 2.0 of the main suspension	48,0
1:2500	2	2,0 (из № 1) 2.0 (from No. 1)	98,0
1:40000	3	2,0 (из № 2) 2.0 (from No. 2)	30,0
1:80000	4	2,0 (из № 2) 2.0 (from No. 2)	62,0
1:160000	5	2,0 (из № 2) 2.0 (from No. 2)	126,0

его хранения. В задачу исследования входило изучение долго-временной стабильности по критериям приемлемости показателей «Специфическая активность», «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность» при хранении серий ОСО в условиях низкой температуры.

Материалы и методы

Материалы

1. Кандидаты в ОСО — это часть (по 1000 ампул) серий вакцины туберкулезной, изготовленных в период с 2014 по 2019 г. ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России из посевной серии 368щ *Mycobacterium bovis*, субштамм BCG-I (Россия). Форма выпуска — лиофилизат, по 0,5 мг в ампуле. Эти кандидаты для ОСО были выбраны из готовых к выпуску серий туберкулезной вакцины, соответствующих требованиям нормативной документации по всем показателям качества. При этом одним из основных критериев отбора являлась стандартность показателя «Общее содержание бактерий», что отражает стандартность розлива препарата («внутриэкземплярная однородность серии»). Образцы для ОСО 42-28-420-П (табл. 1) хранили в морозильной камере при температуре минус $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение всего срока исследования, куда их помещали сразу после получения от изготовителя.

После аттестации образцы каждой серии ОСО применяли в течение года их действия в качестве препарата сравнения при сертификационном контроле промышленных серий туберкулезных вакцин.

2. Среда Левенштейна–Йенсена — селективная плотная питательная среда была приготовлена согласно документу WHO In vitro assays of BCG products⁵.

Методы

Оценку образцов ОСО по показателям «Общее содержание бактерий» (СБ) и «Дисперсность» (Д) проводили фотометрическим методом на фотозлектроколориметре⁶ КФК-3 при параллельном испытании с действующим ОСО.

Для характеристики показателя «Специфическая активность» ОСО использовали методику, разработанную и валидированную Техническим комитетом по стандартизации ВОЗ⁷, которая широко применяется в международной практике производства и контроля вакцины БЦЖ.

Содержимое 5 ампул (лиофилизат) от каждой серии ресуспендировали в 0,9% растворе натрия хлорида до содержания 0,5 мг в 1 мл — основная взвесь, которую последовательно разводили согласно схеме (табл. 2), используя валидированные дозаторы механические одноканальные (Sartorius Biohit, Финляндия) соответствующего объема.

Разведения ОСО 1:40000 (3) и 1:80000 (4) высевали по 0,1 мл суспензии на 4 пробирки каждое, а разведение 1:160 000 (5) — на 8 пробирок со скошенной средой Левенштейна–Йенсена. Пробирки помещали в термостат при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через 28 сут (БЦЖ — медленно растущие микобактерии) подсчитывали количество выросших колоний, т. е. количество колониеобразующих единиц (КОЕ), и определяли число жизнеспособных микобактерий БЦЖ в 1 мг препарата. Эту методику принято называть «тест КОЕ». Исследование проводили при параллельном испытании с действующим ОСО.

При расчете количества жизнеспособных клеток БЦЖ использовали в зависимости от числа выросших колоний одну из 4 формул:

- если число колоний соответствует $2\omega \geq \bar{X}_1 + \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3$, то расчет проводят по формуле $\frac{d_1}{V} \frac{1}{2} (\bar{X}_1 + \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3)$, (1)

⁵ WHO In vitro assays of BCG products. WHO/TB Technical Guide/77.9/unpublished working document in 1977.

⁶ Там же.

⁷ Там же.

- если число колоний соответствует

$$\bar{X}_1 + \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3 \geq 2\omega \geq \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3,$$

то расчет проводят по формуле $\frac{d_2}{V} \frac{\omega \bar{X}_1}{2\omega + \bar{X}_1 - (\bar{X}_2 + 2\bar{X}_3)},$ (2)

- если число колоний соответствует $\bar{X}_2 + 2\bar{X}_3 \geq 2\omega \geq 2\bar{X}_3,$

то расчет проводят по формуле $\frac{d_3}{V} \frac{\omega \bar{X}_2}{2\omega + \bar{X}_2 - 2\bar{X}_3},$ (3)

- если число колоний соответствует $2\bar{X}_3 \geq 2\omega,$

то расчет проводят по формуле $\frac{d_3}{V} \bar{X}_3,$ (4)

где $\bar{X}_1$ — среднее число колоний, выросших при посеве разведения 3, $\bar{X}_2$ — при посеве разведения 4, $\bar{X}_3$ — при посеве разведения 5 (табл. 2), d — величина разведения, V — объем засеянной на пробирку взвеси, ω — постоянное число, равное 40.

Статистическая обработка данных. Результаты обрабатывали с помощью программы Microsoft Office Excel. Определяли среднее значение ($\bar{X}$) и стандартное отклонение (SD). При оценке различий между средними величинами применяли t -критерий Стьюдента. Различия показателей считались статистически достоверными при 95% уровне значимости [3].

Результаты

В таблице 3 представлены результаты оценки 5 серий ОСО 42-28-420-П по показателям «Общее содержание бактерий» (СБ) и «Дисперсность» (Д), полученные при их аттестации, мониторинге показателей в течение года действия ОСО и по окончании хранения этих серий (ноябрь 2019 г.).

Анализ данных аттестации серий ОСО (табл. 3) выявил, что показатель «Дисперсность» серий находится в пределах 1,65–2,0, что соответствует требованиям нормативной документации.

Мониторинг показателя «Дисперсность» за год действия ОСО позволил установить статистически незначимые колебания значений этого показателя между образцами в каждой серии. Также не было отмечено влияния низкой температуры хранения и продолжительности ее действия на данный показатель.

Оценка результатов мониторинга показателя «Общее содержание бактерий», который определяется, как и предыдущий, по оптической плотности фотометрическим методом, также подтверждает стандартность образцов внутри каждой серии. Содержание бактериальной массы БЦЖ (*M. bovis* BCG-1) в ампулах при аттестации и мониторинге серии было практически одинаковым (различия между показателями статистически недостоверны). Полученные данные также свидетельствуют об адекватности мероприятий, проводимых на стадии отбора серии — кандидата ОСО туберкулезной вакцины из промышленных серий. При оценке показателя «Общее содержание бактерий» в процессе длительного (до 6 лет) хранения образцов в заявленных условиях испытания — температура минус $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ — также не выявлено статистически значимых различий между показателями СБ в начале и по завершении исследования или значительных его изменений.

Таким образом, не выявлено каких-либо признаков влияния низких температур и продолжительности их действия на общее содержание бактерий и на дисперсность ОСО. Так, например, для серии 19 значения показателей СБ составляли 0,16 при аттестации, 0,153 — при мониторинге в течение первого года и 0,15 — через 1 год хранения (завершение испытания), а показатель Д в эти же периоды составлял от 1,87 до 1,8–1,87 соответственно. Для серии 15 показатель СБ при аттестации был равен 0,178, а при мониторинге в течение первого года

и через 4 года последующего хранения — 0,17. Средний показатель дисперсности в эти же периоды также колебался незначительно (от 1,8 до 1,83–1,85 соответственно).

Результаты изучения «Специфической активности» — основного показателя качества ОСО 42-28-420-П, полученные при аттестации серий, за год их действия, а также к моменту завершения исследования, представлены в таблице 4.

Анализ этих результатов позволил сделать заключение, что специфическая активность испытуемых серий не снижалась ниже допустимых нормативной документацией лимитов (от 10 до 20 млн/мг) в процессе длительного хранения препарата. Однако количество жизнеспособных клеток в 1 мг серии 14 ОСО через 6 лет хранения достоверно снизилось относительно этого показателя, полученного при ее аттестации и мониторинге.

При аттестации и мониторинге серии ОСО 42-28-420-15, показатель теста КОЕ был практически однозначным: $17,80 \pm 1,56$ и $17,4 \pm 1,9$ млн/мг соответственно. Через 5 лет хранения этой серии в условиях низких температур результат теста КОЕ снизился до значения $14,23 \pm 0,875$, однако статистическую значимость различий между показателями специфической активности доказать не удалось. Анализ этих результатов позволил сделать заключение, что специфическая активность изучаемых серий оставалась в допустимых пределах в процессе длительного (до 5 лет) хранения препарата при температуре минус $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$. Тем не менее при решении вопроса о сроке годности ОСО 42-28-420-П при хранении серий в рекомендованных условиях данные об изменении показателя «Специфическая активность» ОСО 42-28-420-15 были приняты во внимание.

Таким образом, полученные данные изучения стабильности основных показателей качества ОСО туберкулезной вакцины при хранении образцов при температуре минус $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ являются основанием для увеличения срока годности ОСО 42-28-420 с 1 до 5 лет. При этом в течение 5-го года хранения ОСО отмечено начало снижения специфической активности препарата, что согласуется с рекомендацией ВОЗ о возможности продления срока годности вторичных стандартов до 4 лет в условиях хранения образцов при температуре минус 20°C .

Обсуждение

Стабильность стандартного образца, т. е. его свойство сохранять аттестуемые показатели в заданных границах, имеет большое значение в практике производства и контроля ИЛП, так как использование одной и той же серии СО в течение длительного времени позволяет минимизировать ошибки при контроле готовой продукции.

Стабильность свойств вакцины БЦЖ, следовательно, срок годности препарата, зависит от особенности технологии производства (субштамм БЦЖ, состав среды культивирования), валидации всех процессов производства и контроля препарата. Соблюдение условий GMP позволяет производить препарат, соответствующий национальным и международным требованиям, срок годности которого составляет от 1 до 2 лет в условиях хранения при температуре от 2 до 8°C . Эти же требования распространяются на ОСО 42-28-420-П. Увеличение срока стабильности основных свойств ОСО посредством оптимизации температурного режима хранения препарата представляется актуальным.

В 2009 году в NIBSC образцы трех серий-кандидатов МСО BCG были помещены на хранение при температуре минус 20°C для изучения стабильности в реальном времени в течение десяти лет. Критерием изменения специфической активности было снижение количества жизнеспособных микобактерий

Таблица 3. Результаты оценки влияния условий хранения ОСО на показатели качества «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность»

Table 3. Effect of the IRS storage conditions on “Total bacterial count” and “Dispersibility”

№ п/п	Номер серии ОСО 42-28-420-П OSO 42-28-420-P batch number	Средние значения показателя оптической плотности, ОЕ Mean absorbance, AU					
		Общее содержание бактерий, $X \pm SD/n^*$ Total bacterial count, $X \pm SD/n^*$			Дисперсность, $X \pm SD/n^*$ Dispersibility, $X \pm SD/n^*$		
		Аттестация ОСО IRS certification	Мониторинг (в течение года действия) Monitoring (during the year of use)	Завершение хранения (ноябрь 2019) End of the storage period (November 2019)	Аттестация ОСО IRS certification	Мониторинг (в течение года действия) Monitoring (during the year of use)	Завершение хранения (ноябрь 2019) End of the storage period (November 2019)
1	14	0,171 $\pm$ 0,01 / 10	0,173 $\pm$ 0,015 / 3	0,169 $\pm$ 0,01 / 3	1,82 $\pm$ 0,12 / 10	1,86 $\pm$ 0,134 / 3	1,9 $\pm$ 0,1 / 3
2	15	0,178 $\pm$ 0,01 / 10	0,17 $\pm$ 0,007 / 12	0,17 $\pm$ 0,015 / 3	1,8 $\pm$ 0,015 / 10	1,85 $\pm$ 0,08 / 12	1,83 $\pm$ 0,06 / 3
3	16	0,18 $\pm$ 0,015 / 10	0,17 $\pm$ 0,02 / 24	0,17 $\pm$ 0,013 / 3	1,7 $\pm$ 0,015 / 10	1,78 $\pm$ 0,16 / 24	1,86 $\pm$ 0,1 / 3
4	17	0,17 $\pm$ 0,015 / 10	0,17 $\pm$ 0,02 / 22	0,17 $\pm$ 0,015 / 3	1,9 $\pm$ 0,08 / 10	1,88 $\pm$ 0,15 / 22	1,97 $\pm$ 0,06 / 3
5	18	0,17 $\pm$ 0,01 / 10	0,162 $\pm$ 0,03 / 29	0,15 $\pm$ 0,01 / 3	1,9 $\pm$ 0,09 / 10	1,93 $\pm$ 0,14 / 29	1,85 $\pm$ 0,07 / 3
6	19	0,16 $\pm$ 0,03 / 10	0,153 $\pm$ 0,03 / 19	0,15 $\pm$ 0,002 / 3	1,87 $\pm$ 0,05 / 10	1,84 $\pm$ 0,15 / 19	1,87 $\pm$ 0,06 / 3

Примечание. ОЕ — оптическая единица.

* В числителе представлено среднее значение показателя и его стандартное отклонение, в знаменателе — число наблюдений.

Note. AU—absorbance unit.

*The numerator is the mean value and standard deviation, the denominator is the number of observations.

Таблица 4. Результаты оценки влияния хранения ОСО при температуре минус (20 $\pm$ 1) °C на показатель качества «Специфическая активность»

Table 4. Effect of the IRS storage at $-(20 \pm 1)$ °C on “Specific activity”

№ п/п	Номер серии ОСО 42-28-420-П OSO 42-28-420-P batch number	Число жизнеспособных клеток БЦЖ, млн/мг Number of viable BCG cells, mln/mg		
		Аттестация (исходные данные) $X \pm SD/n^*$ Certification (baseline data) $X \pm SD/n^*$	Мониторинг в течение года действия серии $X \pm SD/n^*$ Monitoring during the year of use $X \pm SD/n^*$	Завершение хранения (ноябрь 2019) $X \pm SD/n^*$ End of the storage period (November 2019) $X \pm SD/n^*$
1	14	19,12 $\pm$ 2,4 / 12	18,99 $\pm$ 2,14 / 32	12,85 $\pm$ 0,845 / 3
2	15	17,80 $\pm$ 1,56 / 6	17,4 $\pm$ 1,9 / 25	14,23 $\pm$ 0,875 / 3
3	16	15,9 $\pm$ 2,09 / 8	17,47 $\pm$ 1,5 / 26	16,18 $\pm$ 1,225 / 3
4	17	19,45 $\pm$ 2,05 / 8	19,55 $\pm$ 1,95 / 22	18,26 $\pm$ 3,2 / 3
5	18	15,93 $\pm$ 1,82 / 7	15,7 $\pm$ 2,5 / 20	16,83 $\pm$ 1,0 / 3
6	19	15,9 $\pm$ 1,73 / 8	16,27 $\pm$ 2,26 / 19	17,33 $\pm$ 1,8 / 3

* В числителе представлено среднее значение показателя, в знаменателе — число наблюдений.

*The numerator is the mean value, the denominator is the number of observations.

БЦЖ (тест КОЕ). В первый год было проведено три испытания (с интервалом 4–5 месяцев) для формирования базовой линии. Эти данные использованы для оценки специфической активности препарата по проценту выживаемости клеток БЦЖ (КОЕ). Результаты испытания первых нескольких лет продемонстрировали отсутствие изменений показателя «Специфическая активность» всех референс-реагентов БЦЖ [2]. До настоящего времени результаты 10-летнего исследования NIBSC, к сожалению, не опубликованы.

Проведенное исследование по установлению срока годности ОСО 42-28-420-П в условиях хранения образцов (при температуре минус (20 $\pm$ 1) °C на большом объеме материала в течение длительного времени (6 лет) позволило оценить долговременную стабильность аттестуемых параметров основных показателей качества («Специфическая активность», «Общее содержание бактерий», «Дисперсность») стандартных образцов 2014–2019 гг., хранившихся при низкой температуре.

Проведенное исследование будет продолжено с целью изучения стабильности серий ОСО 42-28-420-П, предварительно хранившихся в течение 4–5 лет при температуре минус (20 $\pm$ 1) °C, при последующем хранении при температуре от 2 до 8 °C. Несомненный интерес представляет также изучение корреляции показателя «Термостабильность», который устанавливают при контроле вакцины БЦЖ на производстве, и стабильности основных показателей препарата в зависимости от сроков и условий хранения препарата.

К настоящему времени утвержден «Межгосударственный стандарт (ГОСТ) ISO Guide 35-2015»⁸, в котором представлены новые подходы к формированию матрицы планирования исследования стандартных образцов, имеющих биологическую природу, введены термины «неопределенность» и «измерение неопределенности». Дальнейшие исследования стабильности СО с учетом данного документа позволят ответить на ряд не решенных до настоящего времени вопросов оценки стабильности СО [4].

⁸ ГОСТ ISO Guide 35-2015. Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации). Дата актуализации 01.06.2019.

Заключение

Концепция использования стандартного образца при контроле туберкулезных вакцин является основополагающей для обеспечения качества этих препаратов. ОСО 42-28-420-П — это вторичный (национальный, или государственный) стандартный образец. При этом аттестованная характеристика «Специфическая активность» ОСО 42-28-420-П прослеживается к МСО ВОЗ («The 1st WHO Reference Reagent for BCG vaccine of Russian BCG-I sub-strain»). Стабильность препарата зависит от особенностей технологии производства.

Валидация всех процессов производства и контроля позволяет производить препарат, соответствующий национальным и международным требованиям, срок годности которого и, следовательно, ОСО — 1–2 года в условиях хранения при температуре от 2 до 8 °С.

Согласно результатам проведенной работы показатели качества испытуемых образцов препарата до 5 лет хранения оставались в границах значений, установленных в процессе аттестации, что позволяет рекомендовать увеличить срок годности ОСО 42-28-420-П до 4 лет с соблюдением рекомендуемых условий хранения.

Таким образом, в результате проведенных исследований стабильности ОСО 42-28-420 вакцины БЦЖ при хранении в условиях низкотемпературного режима минус (20 ± 1) °С было установлено:

1. Основные показатели качества препарата «Общее содержание бактерий», «Дисперсность» и «Специфическая активность» остаются в пределах аттестованных значений до 5 лет.

2. Срок годности серий ОСО может быть продлен до 4 лет включительно при условии хранения образцов при температуре минус (20 ± 1) °С.

3. Увеличение срока годности ОСО позволит использовать один и тот же эталон сравнения более длительное время, что минимизирует ошибки при оценке показателей качества производственных серий вакцины БЦЖ/БЦЖ-М и сэкономит значительные материальные ресурсы, которые требуются при отборе кандидата и аттестации очередной серии ОСО 42-28-420.

Вклад авторов. Н. В. Александрова — контроль проведения экспериментальных исследований, анализ и обобщение полученных результатов, написание текста статьи; А. А. Савина — оценка образцов ОСО по показателям «Общее содержание бактерий», «Дисперсность», «Специфическая активность», статистическая обработка данных; А. В. Наконечная — оценка образцов ОСО по показателям «Общее содержание бактерий», «Дисперсность», «Специфическая активность»; Д. Т. Леви — планирование исследова-

ния и руководство проведением исследования, анализ и обобщение полученных результатов, написание и редактирование текста статьи.

Authors' contributions. Natalia V. Aleksandrova—control of the experimental research, analysis and summarising of the obtained results, writing of the paper; Anna A. Savina—assessment of "Total bacterial count", "Dispersibility", and "Specific activity" of IRS samples, statistical processing of the results; Alla V. Nakonechnaya—assessment of "Total bacterial count", "Dispersibility", and "Specific activity" of IRS samples; Diana T. Levi—planning and supervision of the study, analysis and summarising of the obtained results, writing and editing of the paper.

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).

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).

Конфликт интересов. Д. Т. Леви является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Diana T. Levi is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Ho MM, Markey K, Rigsby P, Hockley J, Corbel MJ. Report of an International collaborative study to establish the first WHO Reference Reagents for BCG vaccines of three different sub-strains. *Vaccine*. 2011;29(3):512–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.066>
2. Dagg B, Hockley J, Rigsby P, Ho MM. The establishment of sub-strain specific WHO Reference Reagents for BCG vaccine. *Vaccine*. 2014;32(48):6390–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.09.065>
3. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Изд-во «Практика»; 1999. [Glantz S. *Biomedical statistics*. Moscow: Publishing house "Practice"; 1999 (In Russ.)]
4. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. [Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of certification procedures for reference standards of biological drugs. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;51(8):716–21 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Александрова Наталья Владимировна, канд. мед. наук. Natalia V. Aleksandrova, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1069-8065>

Савина Анна Александровна. Anna A. Savina. SPIN-код РИНЦ: 2103-3590, AuthorID: 936217

Наконечная Алла Витальевна. Alla V. Nakonechnaya. SPIN-код РИНЦ: 7064-9350, AuthorID: 936279

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф. Diana T. Levi, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0783-9282>

Поступила 15.07.2020

После доработки 30.07.2020

Принята к публикации 28.08.2020

Received 15 July 2020

Revised 30 July 2020

Accepted 28 August 2020

Сравнительный анализ красителей, используемых при оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом *in vitro*

О. В. Головинская*, М. Л. Байкова, Н. А. Алпатова, Д. А. Зубков, В. В. Фоменко, Л. А. Гайдерова

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

При оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима отечественных и зарубежных производителей биологическим методом *in vitro* применяются различные виды красителей. Для унификации методики с использованием клеточной культуры, позволяющей оценивать специфическую активность филграстима, важен выбор одного из красителей, используемых для окрашивания клеток. **Цель работы:** сравнительное изучение красителей тетразолиевого и резазуринового рядов в испытаниях по определению способности филграстима активировать пролиферацию чувствительных клеток. **Материалы и методы:** использовали клеточную линию NFS-60 (клетки миелолейкоза мышей), 2-й Международный стандарт гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (МСО), красители МТТ, МТС, WST-1, alamarBlue. Оценку пролиферативной активности клеток проводили в условиях *in vitro*. Уровень пролиферации клеток учитывали по интенсивности флуоресценции или абсорбции. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Origin Pro 9.1. и приложения Microsoft Excel. **Результаты:** приведена сравнительная характеристика наиболее часто используемых красителей. Описана процедура выбора оптимальных условий проведения испытания с некоторыми из изучаемых красителей. Для анализа потенциальной возможности влияния на конечный результат рассмотрены такие факторы, как продолжительность инкубации клеточной суспензии с МСО и с красителем, состав лизирующего буфера (для окрашивания с помощью МТТ) и различные режимы считывания. Несмотря на то что все изученные красители в заданных условиях испытания позволили получить воспроизводимые кривые «доза–эффект», значения 50% эффективных концентраций статистически значимо не отличались только между испытаниями с использованием трех красителей: МТТ, МТС и alamarBlue ($p > 0,05$). **Выводы:** лучшая воспроизводимость результатов была получена в испытаниях с использованием МТТ и alamarBlue. Более простая и менее продолжительная процедура испытания с alamarBlue, отсутствие стадии лизиса клеток и необходимости применения дополнительных реагентов позволяет рекомендовать этот краситель для унификации методики, проводимой в связи с разработкой проекта общей фармакопейной статьи.

Ключевые слова: анализ пролиферации клеток; МТТ-тест; специфическая биологическая активность филграстима; соли тетразолия; alamarBlue; резазурин; МТС; WST-1; клеточная линия NFS-60; гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

Для цитирования: Головинская ОВ, Байкова МЛ, Алпатова НА, Зубков ДА, Фоменко ВВ, Гайдерова ЛА. Сравнительный анализ красителей, используемых при оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(3):193–201. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-193-201>

***Контактное лицо:** Головинская Ольга Вячеславовна; golovinskaya@expmed.ru

Comparative Analysis of Dyes Used in the Assessment of Filgrastim Products Specific Activity by Biological *in vitro* Methods

O. V. Golovinskaya*, M. L. Baykova, N. A. Alpatova, D. A. Zubkov, V. V. Fomenko, L. A. Gayderova

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

Assessment of specific activity of Russian and foreign-made filgrastim products by biological *in vitro* methods is performed using different types of dyes. It is important to choose one cell staining dye in order to align the procedure of filgrastim specific activity assessment using cell culture. **The aim of this study** was to perform comparative assessment of tetrazolium and resazurin dyes in tests determining filgrastim ability to activate proliferation of sensitive cells. **Materials and methods:** NFS-60 (mouse myelogenous leukemia) cell line, 2nd International Standard for Granulocyte Colony Stimulating Factor (IS), as well as MTT, MTS, WST-1, and alamarBlue dyes were used in the study. Proliferative activity of cells was assessed *in vitro*. The level of cell proliferation was assessed by fluorescence or absorbance intensity. Origin Pro 9.1. and Microsoft Excel applications were used for statistical processing of the obtained results. **Results:** the paper compares characteristics of the most widely used dyes.

It describes the procedure for choosing optimal test conditions for some of the studied dyes. The authors analysed the potential of some factors, such as duration of cell suspension incubation with IS and with a dye, composition of the lysis buffer (for MTT staining), and different readout modes, to influence the final results. Despite the fact that all the studied dyes gave reproducible dose–response curves under the given test conditions, 50% effective concentrations showed no statistically significant differences in tests with only three dyes: MTT, MTS, and alamarBlue ($p > 0.05$). **Conclusions:** better reproducibility of results was obtained in tests using MTT and alamarBlue. The test procedure using alamarBlue is easier to perform and less time-consuming, it does not include the cell lysis stage and does not require additional reagents, therefore this dye may be recommended for harmonisation of the test procedure to be elaborated for the Russian Pharmacopoeia.

Key words: cell proliferation assay; MTT test; filgrastim specific biological activity; tetrazolium salts; alamarBlue; resazurin; MTS; WST-1; NFS-60 cell line; granulocyte colony stimulating factor

For citation: Golovinskaya OV, Baykova ML, Alpatova NA, Zubkov DA, Fomenko VV, Gayderova LA. Comparative analysis of dyes used in the assessment of filgrastim products specific activity by biological *in vitro* methods. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(3):193–201. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-193-201>

Corresponding author: Olga V. Golovinskaya; golovinskaya@expmed.ru

Разработка методов оценки эффективности биотехнологических лекарственных препаратов тесно связана с культивированием клеток, поскольку под влиянием биологически активных веществ клетки могут претерпевать изменения в морфологии, скорости клеточного роста, времени гибели и степени дезинтеграции [1]. Использование соответствующих культур клеток позволяет установить механизм действия биотехнологических препаратов непосредственно на клеточном уровне и учесть их сложные синергические и (или) разнонаправленные эффекты [2].

При изучении биологических эффектов указанных препаратов оценка степени пролиферации клеток нередко является основной целью эксперимента [3, 4]. Существует множество способов определения количества и оценки жизнеспособности клеток, однако в биотехнологии, клеточной биологии, гистохимии, а также при проведении биомедицинских исследований особенно часто используются методы определения метаболической активности. При этом интенсивность считываемого сигнала прямо пропорциональна количеству пролиферирующих клеток [1, 3, 5].

Активность гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) проявляется за счет связывания со специфическим трансмембранным рецептором различных гемопоэтических клеток (стволовые клетки, предшественники мультипотентных клеток, предшественники миелоидных клеток, нейтрофилов и моноцитов). В клинической практике используются препараты Г-КСФ, полученные с помощью технологии рекомбинантной ДНК в системе клеток *Escherichia coli* (филграстим) или в системе клеток яичника китайского хомячка (СНО) (ленограстим). Специфическую активность препаратов филграстима оценивают биологическим методом *in vitro* по стимулирующему действию на пролиферацию клеток (линий NFS-60 или M-NFS-60), рост которых зависит от присутствия гемопоэтических факторов [6].

Сравнительный анализ методик оценки специфической активности с использованием биологического метода в условиях *in vitro*, включенных в нормативную документацию лекарственных средств на основе филграстима отечественных и зарубежных производителей, а также методики, изложенной в Европейской фармакопее¹, выявил наиболее существенные различия в процедурах проведения испытаний и позволил сделать вывод о необходимости унификации указанной методики. Исследования, проведенные нами ранее (данные не представлены), позволили выбрать наиболее чувствительную к фил-

грастиму линию клеток мышинного миелолейкоза (NFS-60), установить оптимальный диапазон концентраций международного стандартного образца Г-КСФ для определения активности лекарственных средств на основе филграстима (от 104,0 до 0,05 МЕ/мл), а также определить оптимальное значение плотности клеточной суспензии ($1,5 \times 10^5$ кл/мл).

В качестве красителей, используемых для идентификации клеток, пролиферирующих под влиянием филграстима в условиях *in vitro*, согласно нормативной документации на зарегистрированные препараты, применяются такие, как MTT, WST-1, alamarBlue, XTT, MTS; в соответствующей монографии Европейской фармакопее² рекомендовано использование MTS. На завершающем этапе унификации методики требовалось сравнить особенности и условия использования разных видов красителей.

Цель работы — сравнительное изучение красителей тетразолиевого и резазуринового рядов в испытаниях по определению способности филграстима активировать пролиферацию чувствительной линии клеток.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: подбор экспериментальным путем оптимальных условий для проведения испытания с использованием каждого из красителей (MTT, WST-1, alamarBlue, MTS); на основании результатов проведенных испытаний определение красителя, наилучшим образом подходящего для унифицированной методики.

Перечень и характеристика используемых красителей

В данном исследовании для оценки степени пролиферации культур клеток в качестве красителей использовали различные коммерчески доступные реактивы, такие как MTT, WST-1, alamarBlue, MTS.

Первым и, вероятно, наиболее известным метаболическим красителем является 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (MTT) [3, 4].

MTT-тест — количественный колориметрический анализ, в котором растворимая желтая тетразолиевая соль MTT проникает через мембрану живых клеток и восстанавливается митохондриальными дегидрогеназами до нерастворимых синих кристаллов формазана [5, 7].

Ранее предполагалось, что тетразолиевая соль восстанавливается только в митохондриях, но позже было показано, что в образовании формазана также участвуют восстановители и ферменты, расположенные в других органеллах [4, 5, 8, 9].

¹ 07/2019:2206 Filgrastim concentrated solution. European Pharmacopoeia 10.0.

² Там же.

Образование игольчатых кристаллов нарушает целостность и метаболизм клетки. Поскольку кристаллы образуются внутриклеточно, протоколы анализа с использованием МТТ включают такие процедуры, как лизис клеток и растворение кристаллов формазана перед этапом считывания результатов [3]. Кристаллы формазана растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО) или в смеси HCl–изопропанол [1]. Также могут быть использованы и другие органические растворители, например раствор натрия додецилсульфата [7], диоксан, циклогексан, тетрагидрофуран, диметилформамид и т. д. [5].

При лизисе происходит разрушение живых клеток, то есть МТТ-тест является конечной точкой исследования и не позволяет выполнять анализы в режиме реального времени [1, 3].

Преимуществами указанного теста считают простоту, экономичность и отличную воспроизводимость результатов [1], однако очевидными недостатками являются неизбежная гибель клеток и дополнительная стадия растворения, необходимая для последующего измерения поглощения формазана [3].

Для исключения этапа растворения кристаллов были разработаны тетразолиевые красители второго поколения (сульфированные соли тетразолия), такие как MTS (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий), ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5 карбоксанилид) и производные WST (водорастворимые соли тетразолия) [4, 5, 10]. Клеточное поглощение этих красителей ограничено, поскольку их гидрофильный характер и отрицательный заряд делают их в значительной степени непроницаемыми для клеток, следовательно, механизмы восстановления сульфированных тетразолиевых солей значительно отличаются от восстановления МТТ [5]. Научные данные свидетельствуют о том, что их восстановление происходит на поверхности клетки или на уровне плазматической мембраны посредством трансмембранного переноса электронов [10]. Как правило, все сульфированные соли тетразолия используются в сочетании с акцепторами электронов, такими как mPMS (5-метилфеназин метилсульфат) [10], PMS (метилсульфат 5-метил-феназина), PES (этилсульфат феназина) [3] или менадион, и производят водорастворимые сульфированные формазаны [5, 9]. Это позволяет выполнять анализы в реальном времени [3].

Краситель MTS обычно используется в сочетании с акцепторами электронов PMS или PES, что повышает его чувствительность [4, 10].

Краситель WST-1 (натрия 5-(2,4-дисульфофенил)-2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-2Н-тетразолий) — отрицательно заряженная дисульфированная внутренняя соль, содержащая йодный остаток, которая, предположительно, накапливается в плазматической мембране из-за ее амфифильного характера [5, 10]. Поскольку WST-1 более устойчива в присутствии акцептора электронов mPMS, была создана коммерческая система для оценки пролиферации клеток, содержащая одновременно WST-1 и mPMS [10].

По сравнению с МТТ красители MTS и WST добавляются в культуру клеток без дополнительных стадий, показывают лучшую воспроизводимость и более высокую чувствительность [11]. Кроме того, некоторые протоколы тестов с использованием МТТ требуют полного удаления культуральной среды на стадии растворения кристаллов формазана, что трудновыполнимо при использовании суспензионных культур [1].

Еще одной разновидностью красителей, которые аналогично тетразолиевым используются в качестве индикаторов клеточной метаболической активности, являются резазури-

новые красители [4, 8, 9]. Методы определения с их участием основаны на способности живых клеток восстанавливать водорастворимый темно-синий нефлуоресцирующий резазурин до водорастворимого розового флуоресцентного резоруфина, который диффундирует из клеток в культуральную среду, в которой его можно определить колориметрически или флуориметрически, при этом последний способ признан более чувствительным [1, 4, 8, 12]. Образование этого водорастворимого флуоресцентного продукта является главным преимуществом указанных красителей по сравнению с красителями на основе соли тетразолия [3, 8].

Кроме того резазурины, в отличие от МТТ, восстанавливаются более широким спектром ферментов: митохондриальными или микросомальными ферментами, ферментами дыхательной цепи. Также в восстановлении могут участвовать акцепторы электронов, предпочтительно PMS [1, 3].

Методологические особенности эксперимента с резазурином позволяют использовать в исследовании суспензионные культуры и не требуют лизиса исследуемых клеток, т.е. измерение степени пролиферации клеток при использовании резазурина может быть первой, но не конечной точкой эксперимента [1, 8]. Сообщается также, что анализы на основе резазурина более чувствительны и надежны, чем анализы с использованием тетразолиевых красителей [3].

Краситель alamarBlue — это коммерческий реагент для измерения жизнеспособности клеток на основе резазурина. Его преимуществом является простота использования, нетоксичность для клеток, а также стабильность результатов и легко различимое визуальное изменение цвета окрашивания [13].

Материалы и методы

Материалы

1. Клеточная линия: NFS-60 (цитокинзависимые клетки лимфобластного миелолейкоза мышей) из коллекции культур клеток CLS (Cell Line Service, код 400301, Германия).
2. Культуральная среда: RPMI-1640 без глутамин (ПанЭко, Россия, кат. № с330п), содержащая инактивированную фетальную бычью сыворотку (HyClone, США, кат. № SH30070.03), GlutaMAX (Gibco, США, кат. № 35050061), HEPES (Gibco, США, кат. № 15630-080) и раствор гентамицина 50 мг/мл (ПанЭко, Россия, кат. № A011).
3. Фактор роста при рутинном культивировании клеток: интерлейкин-3 (Sigma-Aldrich, Германия, кат. № 14144).
4. Красители:
 - МТТ, 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (Sigma-Aldrich, США, кат. № M2128);
 - MTS, реагент для определения степени пролиферации клеток, содержащий MTS и PES в одном растворе (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, США, кат. № G3580);
 - WST-1, реагент для определения степени пролиферации клеток, содержащий предварительно смешанные WST-1 и реагент — переносчик электронов (Premix Cell Proliferation Assay, Takara Bio, Германия, кат. № MK400);
 - alamarBlue™, реагент для определения жизнеспособности клеток (Cell Viability Reagent, Invitrogen, США, кат. № DAL1100);
 - раствор трипанового синего 0,4% (Sigma-Aldrich, Германия, кат. № T8154).
5. 2-й международный стандартный образец филграстима (MCO), (WHO 2nd International Standard for Granulocyte Colony Stimulating Factor, Human rDNA-derived, NIBSC code 09/136).

6. Буферный раствор для отмывания клеток от ростового фактора: DPBS, фосфатно-солевой буферный раствор в модификации Дульбекко (Gibco, США, кат. № 141190-144).

7. Реагенты: натрия додецилсульфат, натрия ацетат безводный, N,N-диметилформамид, кислота соляная — аналитического класса.

Методы

Активность МСО Г-КСФ оценивали биологическим методом, основанным на способности филграстима стимулировать пролиферацию клеток линии NFS-60 *in vitro*.

Клетки культивировали в ростовой среде (RPMI-1640 без глутамина, 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки, 2 ммоль GlutaMAX, 25 ммоль HEPES, 50 мкг/мл раствора гентамицина), содержащей в качестве фактора роста интерлейкин-3 (концентрация 2 нг/мл), в CO₂-инкубаторе (IG 150 JOUN SA, Франция) в увлажненной атмосфере 4–6% CO₂ при температуре 37 °С. Для поддержания жизнеспособности пересевов клеток проводили каждые 2–3 сут. Плотность клеточной суспензии составляла $(2,5–5) \times 10^4$ кл/мл в зависимости от интервала между пассажами.

Для подготовки к испытанию клеточную суспензию центрифугировали (Eppendorf, Германия, AG 5804R) при ускорении 250 g в течение 5 мин, удаляли супернатант и ресуспендировали клетки в 15 мл DPBS. Трижды повторяли процедуру центрифугирования для тщательной отмывки клеток от ростового фактора. Затем ресуспендировали осадок в 5 мл среды для анализа (состав среды для анализа аналогичен составу ростовой среды, но не содержит ростовой фактор) и определяли количество и жизнеспособность клеток методом окрашивания с помощью 0,4% раствора трипанового синего [3]. В испытаниях использовали суспензию с плотностью $1,5 \times 10^5$ кл/мл и жизнеспособностью не менее 90%.

Отдельное испытание для каждого набора исследуемых параметров включало минимум 6 независимых определений, для каждого из которых готовили отдельные разведения МСО с активностью 208 МЕ/мл (концентрация 2 нг/мл). Далее производили 12 последовательных двукратных разведений от 208 до 0,1 МЕ/мл (0,001 нг/мл). Образцы каждой серии независимых разведений в трех повторностях вносили в 96-луночный культуральный планшет (Corning, США, кат. № 3599). Затем в лунки, содержащие разведения МСО, вносили равные объемы ранее приготовленной клеточной суспензии с концентрацией $1,5 \times 10^5$ кл/мл (конечная концентрация МСО в лунках, таким образом, снижалась в 2 раза).

В качестве контрольных на каждом планшете дополнительно использовали по 5 лунок (контроль среды и контроль отмывания клеток от ростового фактора), в которые перед добавлением клеточной суспензии вносили среду для анализа и ростовую среду, содержащую филграстим соответственно.

Поскольку для некоторых красителей требовалось подобрать оптимальные экспериментальные условия, дальнейшая процедура анализа включала комбинацию нескольких параметров. Сравнивали различные периоды инкубации клеток с МСО, периоды инкубации с красителями, различные лизирующие буферные растворы для растворения кристаллов формазана (краситель МТТ), а также варианты регистрации сигнала.

Планшеты для испытания после внесения клеток инкубировали в CO₂-инкубаторе во влажной атмосфере 4–6% CO₂ при температуре 37 °С в течение 48 или 72 ч. За несколько часов до внесения красителей аликвоты WST-1 и MTS размораживали. Для МТТ-теста готовили 0,5% раствор МТТ (150 мг МТТ рас-

творяли в 30 мл раствора DPBS). Все красители перед использованием выдерживали при комнатной температуре.

В случае использования тетразолиевых красителей по окончании периода инкубации во все лунки планшетов вносили МТТ, MTS или WST-1 в соответствующих объемах (20% от объема содержимого лунки для MTS и 10% от объема содержимого лунки для других реагентов/красителей) и продолжали инкубацию в тех же условиях в течение 3,5 ч. Учет результатов проводили на планшетном многофункциональном анализаторе (EnSpire, PerkinElmer, Inc., США), при этом в испытаниях с MTS и WST-1 регистрировали абсорбцию при длине волны 490 нм (MTS) или длине волны 450 нм (WST-1).

Испытания с МТТ отличались необходимостью растворения кристаллов формазана в лизирующем буферном растворе. Проведено сравнительное изучение двух растворов, различающихся по составу:

- лизирующий буфер № 1, содержащий 40 г натрия додецилсульфата, 100 мл ацетатного буфера (2,05 г натрия ацетата безводного до 500 мл воды для инъекций, pH 4,7), 100 мл N,N-диметилформамида (DMFA), pH 4,7;

- лизирующий буфер № 2, содержащий 50 г натрия додецилсульфата, 200 мл 0,02 М раствора соляной кислоты.

Инкубация с каждым из используемых для лизиса буферных растворов продолжалась в течение 20 ч, после чего регистрировали уровень абсорбции двумя способами: при длине волны 490 или 550 нм с корректировкой оптической плотности при 690 нм.

В случае использования резазуринового красителя по окончании периода инкубации клеточной суспензии с МСО во все лунки планшетов вносили alamarBlue (10% от объема содержимого лунки) и продолжали инкубацию в тех же условиях в течение 4 и 6 ч. Затем регистрировали уровень флуоресценции при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны эмиссии 620 нм.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation, США), используя регрессионный анализ и 4-параметрическую логарифмическую логистическую модель (4PL) (как рекомендовано в монографии Statistical analysis Европейской фармакопеи³). Диаграммы строили с помощью приложения Microsoft Excel (версия 14.6.4).

Для каждой отдельной серии разведений МСО строили кривые зависимости «доза–эффект». В качестве параметров приемлемости кривой использовали коэффициент детерминации R^2 , характеризующий степень зависимости между регрессионной моделью и исходными данными, а также динамический диапазон анализа, определяемый самым низким и самым высоким сигналами, полученными для серии разведений МСО. Для оценки динамического диапазона определяли отношение максимального значения сигнала (верхняя асимптота) к минимальному значению (нижняя асимптота). Средние значения указанных параметров рассчитывали для всех независимых определений в рамках испытания с одинаковым набором условий.

Эффективные концентрации (EC_{50}), приводящие к 50% усилению пролиферативной активности клеток, определяли исходя из экспериментальных данных, полученных для каждой серии независимых разведений МСО, внесенных на планшет в трех повторностях.

Средние значения EC_{50} вычисляли исходя из минимум шести независимых определений в рамках опыта с одинаковым набором условий.

³ 01/2020:50300 Statistical analysis. European Pharmacopeia 10.0.

На основе значений EC_{50} оценивали вариабельность между испытаниями. Для этого определяли коэффициенты вариации (CV, %) как минимум шести отдельных значений EC_{50} для испытаний с одинаковым набором параметров.

Результаты и обсуждение

О правильно подобранных условиях эксперимента свидетельствует возможность получения надежных и воспроизводимых результатов. Приемлемыми считали следующие характеристики кривой зависимости «доза–эффект»: наличие линейного участка, включающего минимум 3 точки; соотношение асимптот ≥ 2 ; коэффициент детерминации $\geq 0,95$.

Оптимальные параметры проведения испытаний для красителей MTT и alamarBlue установили экспериментальным путем. В анализах с применением коммерческих наборов тетразолиевых красителей (MTS и WST-1) использовали рекомендации

производителей. В таблице 1 приведены обобщенные условия по этапам каждого испытания.

Средние значения коэффициентов детерминации и соотношений верхней и нижней асимптот для графиков зависимости «доза–эффект» каждого испытания приведены в таблице 2.

Все данные, представленные в таблице 2, удовлетворяют установленным критериям приемлемости. Коэффициенты детерминации $>0,95$ свидетельствуют о низкой вероятности ошибки в каждой отдельно взятой экспериментальной модели. Однако результаты испытаний, проведенных в разных условиях, имеют отличия.

При использовании красителя MTT оценивали влияние продолжительности инкубации клеточной суспензии с МСО в течение 48 и 72 ч (испытания 1 и 3 соответственно) на изменение зависимости «доза–эффект». Измерение оптической плотности проводили при длине волны 490 нм. При инкубации в течение 72 ч значение R^2 было выше ($p = 0,008$) по

Таблица 1. Условия проведения испытаний по выбору оптимальных параметров
Table 1. Test conditions for selection of optimal parameters

Номер опыта Test number	Количество независимых испытаний Number of independent tests	Время инкубации МСО* с клетками, ч Time of incubation of IS* with cells, h	Краситель Dye	Время инкубации с красителем, ч Time of incubation with dye, h	Лизирующий буфер Lysis buffer	Время инкубации с лизирующим буфером, ч Time of incubation with lysis buffer, h	Длина волны для учета результатов, нм Wave length, nm	
							Флуоресценция Fluorescence	Абсорбция Absorbance
1	6	48	MTT	3,5	№ 1	20	—	490
2	6	48	MTT	3,5	№ 1	20	—	550–690
3	6	72	MTT	3,5	№ 1	20	—	490
4	6	72	MTT	3,5	№ 1	20	—	550–690
5	6	72	MTT	3,5	№ 2	20	—	490
6	6	72	MTT	3,5	№ 2	20	—	550–690
7	12	48	MTS	3,5	—	—	—	490
8	6	72	WST1	3,5	—	—	—	450
9	6	48	aB	4	—	—	530/620	—
10	6	48	aB	6	—	—	530/620	—
11	6	72	aB	4	—	—	530/620	—

Примечание. «—» неприменимо; aB — alamarBlue.

*2-й Международный стандартный образец Г-КСФ.

Note. — not applicable; aB—alamarBlue.

*WHO 2nd International Standard for Granulocyte Colony Stimulating Factor.

Таблица 2. Средние значения коэффициентов детерминации и соотношений верхней и нижней асимптот для каждого испытания
Table 2. Mean values of determination coefficients and upper to lower asymptote ratios for each test

Номер опыта Test number	Краситель Dye	Количество независимых испытаний Number of independent tests	Количество точек линейного участка Number of points in the line segment	Среднее значение коэффициента детерминации Mean determination coefficient	Среднее значение соотношений верхней и нижней асимптот Mean upper to lower asymptote ratio
1	MTT	6	3	0,96	2,05
2	MTT	6	3	0,96	2,44
3	MTT	6	3	0,98	2,90
4	MTT	6	3	0,99	3,77
5	MTT	6	3	0,97	2,47
6	MTT	6	3	0,96	3,42
7	MTS	12	3	0,98	2,40
8	WST1	6	3	0,98	2,05
9	aB	6	3	0,99	2,67
10	aB	6	3	0,99	3,19
11	aB	6	3	0,99	2,84

Примечание. aB — alamarBlue.

Note. aB—alamarBlue.

сравнению со значением при 48-часовом периоде инкубации. Значение соотношения верхней и нижней асимптот графика в первом случае также было выше ($p = 0,00002$). Изменение параметров считывания результатов на 550 нм с корректировкой оптической плотности при 690 нм (испытания 2 и 4) не привело к существенному изменению параметров кривой в обоих испытаниях, различия оставались статистически значимыми ($p < 0,05$). В дальнейших испытаниях с красителем MTT инкубацию клеток с МСО проводили в течение 72 ч.

Проведено изучение потенциальной возможности использования альтернативных лизирующих буферных растворов в испытаниях с МТТ. При сравнении результатов испытаний, проведенных с растворами № 1 и 2 (испытания 3 и 5 соответственно), установлено, что в обоих случаях характеристики кривой зависимости «доза–эффект» были приемлемыми: $R^2 > 0,95$, отношение максимального значения сигнала к минимальному >2 (табл. 2). Однако при изменении параметров считывания с 490 нм на 550 нм с корректировкой при 690 нм (испытания 4 и 6) отмечены более высокие значения коэффициента детерминации и более широкий динамический диапазон ($p < 0,05$) в случае использования для лизиса клеток буферного раствора с DMFA (буфер № 1).

На основании полученных данных были выбраны оптимальные условия проведения испытания при применении красителя МТТ, а именно: инкубация клеток с МСО в течение 72 ч, использование для растворения кристаллов формазана лизирующего буфера № 1 и регистрация сигнала поглощения при 550 нм с корректировкой при 690 нм (табл. 3).

В испытаниях при использовании для окрашивания пролиферирующих клеток реагентов MTS CellTiter 96® (испытание 7, проведено 12 независимых определений) и WST-1 (испытание 8, проведено 6 независимых определений) получены результаты, свидетельствующие о том, что воспроизводимые кривые зависимости «доза–эффект» имеют выраженный линейный участок, средний коэффициент детерминации равен 0,98, отношение максимального значения оптической плотности к минимальному >2 в обоих случаях.

В испытаниях с использованием alamarBlue изучали влияние разной продолжительности инкубации клеток с МСО (в течение 48 и 72 ч) (испытания 9 и 11), а также определяли оптимальную продолжительность инкубации суспензии клеток с красителем (в течение 4 и 6 ч) (испытания 9 и 10 соответственно).

Как видно из данных, представленных в таблице 2, значения R^2 при 48- и 72-часовом периодах инкубации оказались равными (0,99). Отношения максимального значения флуо-

ресценции к минимальному также существенно не отличались ($p > 0,05$). Полученные данные позволили выбрать 48-часовой период инкубации для последующих испытаний и таким образом сократить их продолжительность. Наблюдение за развитием окрашивания в течение 4 и 6 ч после внесения alamarBlue показало, что с увеличением периода инкубации коэффициент детерминации не изменялся, а динамический диапазон увеличился незначительно ($p = 0,052$) за счет повышения значений флуоресценции «верхнего плато», т. е. только для используемых высоких концентраций МСО. Поэтому далее применяли 4-часовую продолжительность инкубации с alamarBlue.

Следует отметить, что для красителя alamarBlue приемлемо считывание сигнала колориметрически и флуориметрически, однако по данным литературы последний способ признан более чувствительным [1, 4, 8, 12]. В связи с этим в данном исследовании измерение абсорбции не проводили.

По результатам проведенного этапа испытаний для исследуемых красителей определены оптимальные условия их использования в методике оценки способности филграстима стимулировать пролиферацию клеток линии NFS-60 *in vitro*. Обобщенные результаты представлены в таблице 3.

В биологических методах анализа с использованием клеточных культур одной из ключевых характеристик кривой «доза–эффект» является полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}), т. е. концентрация вещества, приводящая к 50% активации уровня пролиферации клеток.

На следующем этапе исследования оценивали, использование какого из красителей позволяет получить наиболее достоверные и воспроизводимые результаты, для этого учитывали средние значения EC_{50} и коэффициенты вариации CV (%).

Расчетные значения EC_{50} , приведенные на рисунке 1, являются средними значениями для 6 (12) независимых определений $\pm$ стандартное отклонение, полученными в испытаниях с подобранными условиями для красителей МТТ и alamarBlue, а также в испытаниях с MTS и WST-1 (табл. 3). Данные наглядно демонстрируют, что в экспериментах с использованием МТТ, MTS и alamarBlue точки перегиба кривой находились на одном уровне и статистически значимо не отличались друг от друга ($p > 0,05$). Значение полумаксимальной эффективной концентрации, полученное при использовании красителя WST-1, оказалось самым высоким, что свидетельствует о его меньшей чувствительности в примененной экспериментальной модели по сравнению с другими красителями ($p < 0,05$) и требует тщательного подбора условий проведения испытания.

Таблица 3. Оптимальные условия проведения испытания для каждого красителя
Table 3. Optimal test conditions for each dye

Краситель Dye	Номер опыта* Test number*	Время инкубации МСО** с клетками, ч Incubation time of 2nd IS** with cells, h	Время инкубации с красителем, ч Time of incubation with dye, h	Лизирующий буфер Lysis buffer	Время инкубации с лизирующим буфером, ч Time of incubation with lysis buffer, h	Длина волны для учета результатов, нм Wave length, nm	
						Флуоресценция Fluorescence	Абсорбция Absorbance
MTT	4	72	3,5	№ 1	20	—	550–690
aB	9	48	4	—	—	530/620	—
MTS	12	48	3,5	—	—	—	490
WST-1	14	72	3,5	—	—	—	450

Примечание. «—» неприменимо; aB — alamarBlue.

*В соответствии с таблицами 1 и 2.

**2-й Международный стандартный образец Г-КСФ.

Note. — not applicable; aB—alamarBlue.

*According to tables 1 and 2.

**WHO 2nd International Standard for Granulocyte Colony Stimulating Factor.

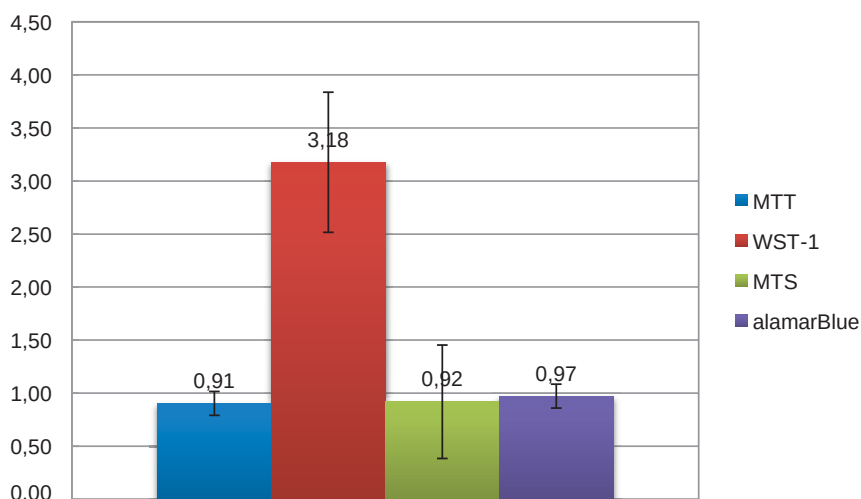


Рис. 1. Средние значения EC₅₀ для испытаний с MTT, WST-1, MTS и alamarBlue. Ось ординат — значения EC₅₀ (ME); ось абсцисс — красители.

Fig. 1. Mean EC₅₀ values for tests with MTT, WST-1, MTS and alamarBlue. Y axis—EC₅₀ values (IU); X axis—dyes.

Далее сравнивали результаты испытаний с применением красителей MTT, MTS и alamarBlue.

Прецизионность аналитической методики характеризует степень близости независимых результатов индивидуальных испытаний, полученных в конкретных установленных условиях, и выражается коэффициентом вариации.

В таблице 4 приведены значения коэффициентов вариации между значениями EC₅₀, полученными для независимых определений в рамках испытания с одинаковым набором условий (в соответствии с таблицей 3). Так, наиболее низкая вариабельность между значениями EC₅₀ получена в испытании 4 с красителем MTT, что соответствует результатам других исследователей [1, 8, 9]. Сходимость результатов в испытании 9 была приемлемой, однако в испытании 7 значение коэффициента вариации было неудовлетворительным. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения дополнительных исследований для подбора оптимальных условий испытания с использованием красителя MTS.

Заключение

Проведенное исследование продемонстрировало потенциальное применение таких известных красителей, как MTT, alamarBlue, MTS и WST-1, в испытаниях по оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом *in vitro*. Подобраны оптимальные условия проведения испытания для части проанализированных красителей.

К биологическим методикам применяются строгие требования: они должны быть достаточно чувствительными для

выявления небольших различий, но достаточно надежными для получения воспроизводимых результатов в различных контролируемых экспериментальных условиях. В испытаниях с применением всех красителей получены результаты, свидетельствующие о воспроизводимости кривых зависимости «доза–эффект» и приемлемости значений исследуемых параметров кривых заданным требованиям.

При сравнении значений полумаксимальных эффективных концентраций было выявлено, что в MTT-тесте, а также при использовании красителей MTS и alamarBlue наблюдались значительно более низкие средние значения EC₅₀, чем при применении WST-1 (0,91 ± 0,06; 0,92 ± 0,53; 0,97 ± 0,11 и 3,18 ± 0,77 ME соответственно), что позволяет сделать вывод о большей чувствительности испытаний с MTT, MTS и alamarBlue. Небольшая вариабельность значений EC₅₀ в рамках одного испытания свидетельствует о повышении устойчивости методики при окрашивании с помощью MTT и alamarBlue (6,29 и 11,55% соответственно). При окрашивании клеток MTS вариабельность полученных результатов была значительно выше (58,04%).

Учитывая, что в испытаниях с использованием WST-1 и MTS в заданных условиях наблюдалась более низкая чувствительность и высокая вариабельность между значениями EC₅₀ соответственно, требуется подбор оптимальных экспериментальных условий для каждого из указанных красителей.

Стабильная воспроизводимость методики способствует тому, что для получения достоверных результатов снижается вероятность проведения повторных испытаний, что сокращает сроки исследований, количество используемых реагентов и расходных материалов.

Таблица 4. Средние значения 50% эффективных концентраций (EC₅₀) и значения коэффициентов вариации (CV) между независимыми определениями

Table 4. Mean 50% effective concentrations (EC₅₀) and coefficients of variation (CV) between independent tests

Номер опыта* Test number*	Краситель Dye	Количество независимых испытаний Number of independent tests	Среднее значение EC ₅₀ , ME Mean EC ₅₀ , IU	CV, %
4	MTT	6	0,91 ± 0,06	6,29
7	MTS	12	0,92 ± 0,53	58,04
9	aB	6	0,97 ± 0,11	11,55

Примечание. aB — alamarBlue.

*В соответствии с таблицами 1 и 2.

Note. aB—alamarBlue.

*According to tables 1 and 2.

Несмотря на то что существенной разницы между результатами, полученными с использованием красителей МТТ и alamarBlue, не выявлено, следует отметить, что более простая и менее продолжительная процедура испытания с alamarBlue, отсутствие стадии лизиса клеток и необходимости применения дополнительных реагентов позволяет рекомендовать этот краситель для использования в испытаниях по определению специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом на клетках линии NFS-60.

Вклад авторов. О. В. Головинская — сбор, анализ и обобщение данных литературы, проведение сравнительного анализа красителей, интерпретация результатов исследования, оформление рукописи; М. Л. Байкова — культивирование клеток, проведение экспериментальных исследований в полном объеме, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; Н. А. Алпатова — планирование и разработка дизайна экспериментального исследования, формулировка темы исследования, редактирование и критический пересмотр содержания текста, формулирование выводов; Д. А. Зубков — сбор данных литературы, работа с графическим материалом, интерпретация результатов; В. В. Фоменко — пробоподготовка образцов и реагентов, культивирование клеток, обобщение и систематизация результатов исследования; Л. А. Гайдерова — обоснование концепции исследования, утверждение темы и плана экспериментального исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. Olga V. Golovinskaya—collection, analysis, and systematisation of literature data, comparative analysis of dyes, interpretation of the study results, formatting of the paper; Marina L. Baykova—cell culturing, performing experiments, obtaining, analysis and systematisation of experimental data; Natalia A. Alpatova—planning and development of the design of experiments, elaboration of the study idea, revision and editing of the text, preparation of conclusions; Dmitry A. Zubkov—collection of literature data, preparation of the graphic material, interpretation of the study results; Victoria V. Fomenko—sample preparation and preparation of reagents, cell culturing, summarizing and systematisation of the study results; Lidia A. Gayderova—substantiation of the concept of the study, approval of the idea and plan of the experimental part of the study, 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-А18-118021590049-0).

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-А18-118021590049-0).

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. Аникина ЛВ, Пухов СА, Дубровская ЕС, Афанасьева СВ, Клочков СГ. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и резазурина. *Фундаментальные исследования*. 2014;(12-7):1423–7. [Anikina LV, Pukhov SA, Dubrovskaya ES, Afanaseva SV, Klochkov SG. Comparative definition of cell viability by MTT and resazurin.

Fundamental'nyye issledovaniya = Fundamental Research. 2014;(12-7):1423–7 (In Russ.)]

2. Лягоскин ИВ, Берестовой МА, Потеряев ДА, Зейналова ЭС, Вишневский АЮ, Казаров АА. Валидация ХТТ-теста для оценки антипролиферативной активности препаратов на основе моноклональных антител. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(1):45–50. [Lyagoskin IV, Berestovoy MA, Poteryaev DA, Zeinalova ES, Vishnevskiy AY, Kazarov AA. Validation of the XTT-test for assessing the antiproliferative activity of biologics on the basis of monoclonal antibodies. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;(1):45–50 (In Russ.)]
3. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In: Gilbert FD, Friedrich O. *Cell Viability Assays (Methods and Protocols)*. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1601. New York: Humana Press; 2017. P. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1
4. Stoddart JM. Cell viability assays: Introduction. In: Stoddart JM, eds. *Mammalian Cell Viability (Methods and Protocols)*. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 740. New York: Humana Press; 2011. P. 1–6. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
5. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018;120(3):159–67. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
6. Мотузова ЕВ, Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Рунова ОБ, Волкова РА, Мыца ЕД и др. Разработка и аттестация отраслевого стандартного образца активности филграстима. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(3):172–8. [Motuzova EV, Alpatova NA, Gayderova LA, Runova OB, Volkova RA, Mytsa ED, et al. Development and certification of an industrial reference standard for determination of filgrastim activity. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(3):172–8 (In Russ.)]
7. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018:095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
8. Bopp SK, Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol*. 2008;8:8. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-8-8>
9. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes*. 2015;8:47. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>
10. Berridge MV, Herst PM, Tan An S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Bio-technol Annu Rev*. 2005;11:127–52. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
11. Tiwari K, Wavdhane M, Haque S, Govender T, Kruger GH, Mishra M, et al. A sensitive WST-8-based bioassay for PEGylated granulocyte colony stimulating factor using the NFS-60 cell line. *Pharm Biol*. 2015;53(6):849–54. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.943248>
12. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the alamarBlue assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018:095489. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095489>
13. Lall N, Henley-Smith CJ, De Canha MN, Oosthuizen CB, Berrington D. Viability reagent, PrestoBlue, in comparison with other available reagents, utilized in cytotoxicity and antimicrobial assays. *Int J Microbiol*. 2013;2013:420601. <https://doi.org/10.1155/2013/420601>

Об авторах / Authors

Головинская Ольга Вячеславовна, канд. мед. наук. *Olga V. Golovinskaya*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6966-9859>

Байкова Марина Леонидовна. *Marina L. Baykova*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9889-4038>

Алпатова Наталья Александровна, канд. биол. наук. *Natalia A. Alpatova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6807-508X>

Зубков Дмитрий Анатольевич. *Dmitry A. Zubkov*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6970-1732>

Фоменко Виктория Валерьевна. *Viktoria V. Fomenko*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8677-0927>

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук. *Lidia A. Gayderova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Поступила 30.04.2020

После доработки 27.07.2020

Принята к публикации 28.08.2020

Received 30 April 2020

Revised 27 July 2020

Accepted 28 August 2020

Изучение стабильности плазмы человека для фракционирования по показателю активности фактора VIII при моделировании отклонений в температурном режиме хранения и транспортировки

А. А. Городков*, А. Л. Попцов, А. Л. Хохряков

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский медицинский научно-производственный центр «Росплазма»
Федерального медико-биологического агентства»,
ул. Ленина, д. 104, Киров, Кировская область, 610002, Российская Федерация

Европейской фармакопеей регламентируется осуществлять транспортировку и хранение плазмы человека для фракционирования при температуре минус 20 °С и ниже, при этом допускается возникновение некоторых отклонений в температурном режиме. В настоящее время согласно требованиям нормативной документации Российской Федерации транспортировка и хранение плазмы, предназначенной для производства препаратов лабильных белков (факторов свертывания крови), должны осуществляться при температуре минус 30 °С и ниже. Возможность наличия отклонений в температурном режиме при этом не оговаривается, что создает определенные трудности в их оценке уполномоченным лицом при выпуске серии плазмы в производство. Основным инструментом в оценке рисков выступает межоперационный контроль активности фактора VIII в плазме с нарушением температурного режима, что влечет значительные финансовые затраты. **Цель работы:** изучение стабильности плазмы человека для фракционирования по показателю активности фактора VIII при моделировании отклонений в температурном режиме хранения и транспортировки с оценкой возможности внесения изменений в требования нормативной документации. **Материалы и методы:** в исследованиях использовали только полные индивидуальные дозы плазмы, полученные методом афереза. Испытания проводили в смоделированных условиях повышенной температуры с четкой, непрерывной фиксацией температуры измерительным комплексом. Определение активности фактора VIII проводили на автоматическом коагулометрическом анализаторе. Количественную оценку результатов осуществляли путем сравнения активности фактора VIII в плазме перед заморозкой и плазме, прошедшей испытания. Статистическую обработку данных проводили методом описательной статистики с использованием прикладных программ Microsoft Excel 2007. **Результаты:** установлено отсутствие значимого влияния краткосрочных отклонений температурного режима хранения на стабильность плазмы человека для фракционирования по показателю активности фактора VIII. **Выводы:** полученные данные являются основанием для обсуждения вопроса об изменении регламентированного температурного режима хранения и транспортировки плазмы человека для фракционирования, а также внесения в нормативные документы значений допустимых краткосрочных отклонений температурного режима в процессе хранения и транспортировки.

Ключевые слова: плазма человека для фракционирования; активность фактора VIII; стабильность; индивидуальная доза плазмы; аферез; анализ рисков

Для цитирования: Городков АА, Попцов АЛ, Хохряков АЛ. Изучение стабильности плазмы человека для фракционирования по показателю активности фактора VIII при моделировании отклонений в температурном режиме хранения и транспортировки. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(3):202–207. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-202-207>

Контактное лицо: Городков Андрей Алексеевич; gorodkov-aa@rosplasma.ru

Study of the Stability of Factor VIII Activity in Human Plasma for Fractionation When Modeling Deviations in the Storage and Transportation Temperature Conditions

A. A. Gorodkov*, A. L. Poptsov, A. L. Khokhryakov

Russian Medical Research and Production Center "Rosplasma"
Federal Medical and Biological Agency,
104 Lenin St., Kirov, Kirov oblast 610002, Russian Federation

The European Pharmacopoeia requires that the transportation and storage of human plasma for fractionation should be carried out at –20 °C or below, while allowing for some deviations in the temperature regime. The current Russian regulatory documentation requires the transportation and storage of plasma intended for the production of labile protein preparations (blood clotting factors) at –30 °C or lower. However, acceptable deviations from the temperature regime are not specified, which creates certain difficulties in their assessment by an authorised person during plasma batch release. The main tool in risk assessment is in-process control of factor VIII activity in plasma stored at inadequate temperature, which entails significant financial costs. **The aim of the study** was to assess stability of factor VIII activity in human plasma for fractionation when modeling deviations in the storage and transportation temperature regime and to assess the possibility of amending the regulatory documentation

requirements. **Materials and methods:** only full individual doses of plasma obtained by apheresis were used in the experiments. The tests were performed under simulated high temperature conditions with accurate continuous recording of temperature by a measuring system. An automatic coagulation analyser was used to determine factor VIII activity. Quantitative evaluation of the results was carried out by comparing factor VIII activity in the plasma before freezing and in the tested plasma. Statistical processing of data was performed by descriptive statistics methods using Microsoft Excel 2007 applications. **Results:** no significant effect of short-term deviations in the storage temperature on the stability of factor VIII activity in human plasma for fractionation was observed. **Conclusions:** the obtained data can be used as a rationale for introducing changes in the official requirements for the storage and transportation temperature regime for human plasma for fractionation, as well as for including details of acceptable short-term deviations of the storage and transportation temperature regime in the regulatory documentation.

Key words: human plasma for fractionation; factor VIII activity; stability; individual plasma dose; apheresis; risk analysis

For citation: Gorodkov AA, Poptsov AL, Khokhryakov AL. Study of the stability of factor VIII activity in human plasma for fractionation when modeling deviations in the storage and transportation temperature conditions. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(3):202–207. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-202-207>

Corresponding author: Andrey A. Gorodkov; gorodkov-aa@rosplasma.ru

Одним из ключевых показателей, определяющим качество плазмы человека для фракционирования и позволяющим провести анализ эффективности процесса ее производства, является активность фактора VIII. Рядом научных исследований доказано влияние на показатель активности фактора VIII в плазме различий в технологии производства, от способа заготовки плазмы и вида антикоагулянта до выбора температурных режимов заморозки, хранения и транспортировки [1, 2].

Одним из важнейших технологических критериев, поддерживающим активность фактора VIII на регламентированном уровне не менее 0,7 МЕ/мл¹ и обеспечивающим стабильность данной фармацевтической субстанции, является температурный режим транспортировки и хранения [3–5]. При этом возникновение отклонений температурного режима транспортировки и хранения в процессе производства плазмы человека для фракционирования неизбежно и обусловлено принципом работы холодильного оборудования (периоды оттаивания), а также техническими неполадками в его работе.

Согласно данным Европейской фармакопеи² температура во время процессов транспортировки и хранения плазмы должна быть минус 20 °C и ниже, а при возникновении отклонений температурного режима плазма разрешается к использованию при выполнении следующих условий:

- плазма находилась при температуре от минус 20 °C и выше не более 72 ч;
- плазма находилась при температуре выше минус 15 °C не более 1 раза краткосрочно;
- температура хранения не превышала температуру минус 5 °C.

Нормативной документацией Российской Федерации регламентируется транспортировка и хранение плазмы человека для фракционирования при более жестких температурных условиях (минус 30 °C и ниже)³, а наличие отклонений в температурном режиме не допускается (по умолчанию). Выполнение этих требований влечет за собой более высокие финансовые затраты при производстве плазмы человека для фракционирования на этапах транспортировки и хранения. При этом отсутствуют научно обоснованные данные о необходимости поддержания такого температурного режима для обеспечения стабильности плазмы. Возникающие в процессе производства

отклонения температурного режима оцениваются уполномоченным лицом по качеству на основе анализа рисков⁴, основным инструментом которого выступает межоперационный контроль активности фактора VIII в плазме с нарушением температурного режима, что также влечет дополнительные финансовые затраты.

Цель работы — изучение стабильности плазмы человека для фракционирования по показателю активности фактора VIII при моделировании отклонений в температурном режиме хранения и транспортировки (стрессовые испытания стабильности) с оценкой возможности внесения изменений в требования нормативной документации.

Материалы и методы

В исследование были включены индивидуальные дозы плазмы (рис. 1), полученные методом афереза на аппарате Autopheresis-C A-200 (Baxter, США) и замороженные в камере холодильной для быстрой заморозки плазмы Kryoplasma SF24 (Angelantoni Industrie S.p.A, Италия) при температуре минус 70 °C в течение 60 мин. Исследованию на стабильность подлежали только полные индивидуальные дозы плазмы объемом 668 мл без признаков гемолиза и хилеза с четкой маркировкой.

Для плазмы человека для фракционирования как фармацевтической субстанции, хранящейся при отрицательных значениях температуры, неприменимы общепринятые методы изучения стабильности ввиду уникальности свойств ее биологической природы и невозможности проведения многократного контроля каждой индивидуальной дозы плазмы⁵.

При планировании экспериментов использовали компромиссный подход: чем больше количество параллельных испытаний — тем надежнее результаты, чем меньше испытаний — тем ниже общая стоимость исследований. Этапом рандомизации был выбор температур и контрольных временных точек моделируемых испытаний.

В каждом испытании использовали индивидуальные дозы плазмы с разной активностью фактора VIII, поэтому было важно определить активность фактора нативной плазмы, что позволило свести к минимуму число повторных испытаний и получить статистически достоверную информацию. Для этого из каждой индивидуальной дозы перед замораживанием были

¹ Фармакопейная статья 3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования (утв. Приказом Минздрава России от 29.03.2019 № 185).

² Human plasma for fractionation. European Pharmacopoeia. 10th ed.

³ Фармакопейная статья 3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования (утв. Приказом Минздрава России от 29.03.2019 № 185).

⁴ Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики».

⁵ Общая фармакопейная статья 1.1.0009.18 Стабильность и сроки годности лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

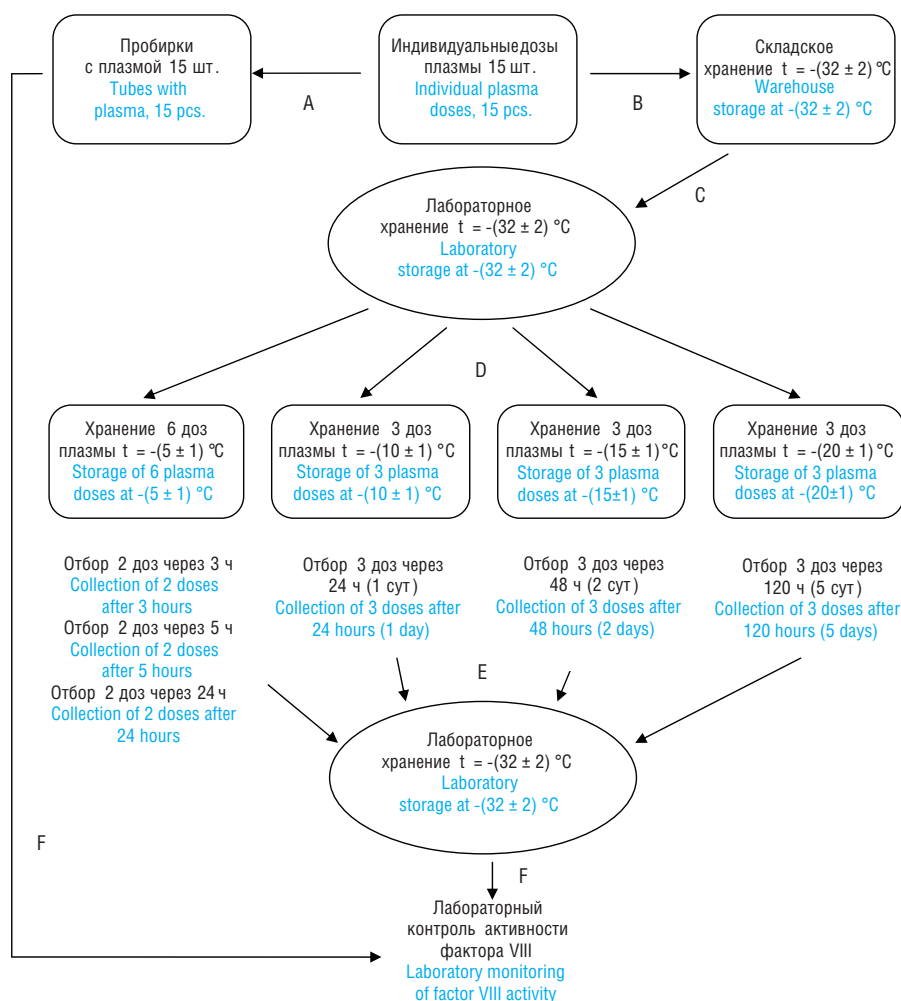


Рис. 1. Схема проведения стрессовых испытаний плазмы человека для фракционирования. (А) отбор из каждой индивидуальной дозы образца с нативной (незамороженной) плазмой; (В) транспортировка замороженных индивидуальных доз плазмы на склад и хранение при температуре минус 30 °С и ниже; (С) подготовка условий испытаний, транспортировка замороженных индивидуальных доз плазмы в лабораторию и хранение при температуре минус 30 °С и ниже; (D) проведение испытаний, помещение индивидуальных доз плазмы в среду с заданным температурным режимом хранения на выбранный временной интервал; (Е) извлечение прошедших испытание индивидуальных доз, перемещение в лабораторию, хранение при температуре минус 30 °С и ниже; (F) лабораторный контроль образцов с нативной плазмой (определение исходной активности фактора VIII), лабораторный контроль индивидуальных доз плазмы после проведения испытаний по показателю активности фактора VIII.

Fig. 1. Scheme for conducting stress tests of human plasma for fractionation. (A) sampling from each individual dose of a sample with native (not frozen) plasma; (B) transportation of frozen individual plasma doses to the warehouse and storage at -30°C or below; (C) preparation of test conditions, transportation of frozen individual plasma doses to the laboratory and storage at -30°C or below; (D) carrying out testing, placing individual plasma doses in a medium with a specified storage temperature for a defined time interval; (E) withdrawal of the tested individual doses, transferring them to the laboratory, storage at -30°C or below; (F) laboratory control of samples with native plasma (determination of the initial activity of factor VIII), laboratory control of the individual plasma doses that have been tested for factor VIII activity.

отобраны образцы в пробирки и доставлены в лабораторию для определения активности фактора VIII нативной плазмы.

Индивидуальные дозы плазмы после заморозки и прохождения всех стадий технологического процесса, складского хранения и транспортировки помещали на временное хранение при температуре минус 30 °С и ниже в холодильное оборудование лаборатории, а затем подвергали стрессовым испытаниям по приведенной схеме (рис. 1).

В ходе испытаний индивидуальные дозы плазмы в указанном количестве помещали на хранение в моделируемые условия (температурный режим, временной интервал), после чего возвращали на хранение при температуре минус 30 °С и ниже

в лабораторию. Тем самым создавали условия искусственного воздействия отклонений от температурного режима хранения и транспортировки на качество плазмы человека для фракционирования.

Моделируемые условия подразумевали четкий контроль и фиксацию температурного режима для каждого опыта. Испытания проводили с использованием холодильно-обогревательной установки Thermo King V300 MAX 50 (Thermo King, США) на базе автомобиля Mercedes Sprinter. Регистрацию температуры вели с помощью измерительного комплекса iBDL Ревизор модель iBDLR-L (ООО «НТЛ «Элин», Россия). Кратковременные резкие колебания вследствие вынужденного отта-

Таблица 1. Результаты стрессовых испытаний стабильности плазмы по показателю активности фактора VIII
Table 1. Results of stress tests of plasma stability in terms of factor VIII activity

Количество образцов, n_j Number of samples, n_j	Исходная активность фактора VIII, $x_{j,p}$ МЕ/мл Initial factor VIII activity, $x_{j,p}$ IU/mL	Температура испытаний, °C Test temperature, °C						Среднее изменение состояния, Δ_j Mean change of activity, Δ_j		Среднее значение активности, A_j МЕ/мл Mean activity, A_j IU/mL		
		-5		-10		-15					-20	
		Временные точки Δt_p , ч Time points Δt_p , h										
		3	5	24	24	48	120					
		Активность фактора VIII, $y_{j,p}$ МЕ/мл Factor VIII activity, $y_{j,p}$ IU/mL						МЕ/мл IU/mL	%			
2	1,19	0,98	—	—	—	—	—	-0,3	23	1,03		
	1,47	1,08										
2	1,21	—	1,22	—	—	—	—	-0,02	2	1,28		
	1,39		1,35									
2	1,28	—	—	1,05	—	—	—	-0,05	4	1,08		
	0,97			1,10								
3	1,64	—	—	—	1,70	—	—	-0,38	19	1,64		
	2,31				1,73							
	2,10				1,48							
3	1,06	—	—	—	—	0,84	—	-0,08	6	1,15		
	1,23					1,49						
	1,42					1,13						
3	1,84	—	—	—	—	1,58	-0,3	20	1,24			
	0,96					0,80						
	1,80					1,33						
$\Sigma n_j = 15$	1,46 ± 0,22	Условие стабильности плазмы: Plasma stability condition:								$A_j \geq A_{min}$ $A_{min} \geq 0.7$		

Примечание. «—» неприменимо.
Note. — not applicable.

ивания холодильников, открывания дверей, средств для хранения и транспортировки принимались как неизбежные и не учитывались при анализе результатов исследований.

Количественную оценку результатов испытаний осуществляли путем сравнения активности фактора VIII в плазме перед заморозкой (исходная активность) и активности фактора VIII в индивидуальных дозах плазмы, прошедших все этапы технологического процесса заготовки, стрессовые испытания и размораживание.

Оттаивание индивидуальных доз проводили при температуре 35 °C в течение 15 мин в размораживателе плазмы THERMOGENESIS MT204 (ThermoGenesis, США)⁶.

Определение активности фактора VIII осуществляли по верифицированной и описанной методике [6] на автоматическом коагулометрическом анализаторе ACL ELITE PRO (Instrumentation Laboratory Company, США) с использованием набора реагентов ELECTRACHROME™ Factor VIII (Instrumentation Laboratory Company, США). За условие стабильности плазмы для каждого опыта принимали показатель активности фактора VIII, равный или превышающий 0,7 МЕ/мл. Расчет среднего значения активности фактора VIII после каждого вида испытаний проводили по формуле:

$$A_j = \sum x_{j,i} / n_j + \Delta_j \geq A_{min}, \quad (1)$$

где A_j — среднее значение активности фактора VIII в плазме человека для фракционирования после каждого вида испытаний, МЕ/мл; $\sum x_{j,i} / n_j$ — среднее арифметическое значение активно-

сти фактора VIII в образцах нативной плазмы для каждого вида испытаний, МЕ/мл; n_j — количество образцов для каждого вида испытаний ($n_j = 2-3$); Δ_j — среднее изменение активности фактора VIII в прошедших этапы быстрой заморозки, хранения, стрессовых испытаний и оттаивания индивидуальных доз плазмы $y_{j,i}$ по сравнению с исходным уровнем активности $x_{j,i}$ (среднее изменение состояния), МЕ/мл; A_{min} — минимальное допустимое значение активности фактора VIII в прошедших испытаниях индивидуальных доз плазмы, $A_{min} = 0,7$ МЕ/мл.

Статистическую обработку данных проводили методом описательной статистики с использованием прикладных программ Microsoft Excel 2007. При расчете доверительных интервалов использовали значение коэффициента Стьюдента при значении вероятности $P = 0,95^7$.

Результаты и обсуждение

Поскольку плазма человека для фракционирования — это биологический субстрат, характеристики которого зависят от индивидуальных особенностей и здоровья конкретного донора, перед началом расчетов для исключения выпадающих значений была проведена проверка однородности выборки по исходной активности фактора VIII. Для представленной выборки из 15 образцов ($n \geq 10$) и рассчитанного стандартного отклонения $S = 0,4$ для всех вариантов отклонений $d_j = x_{j,i} - \sum x_{j,i} / \sum n_j$ сохраняется условие $|d_j| \leq 3S$, что позволяет предполагать однородность выборки⁸.

⁶ Фармакопейная статья 3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования (утв. Приказом Минздрава России от 29.03.2019 № 185).

⁷ ГОСТ Р 50779.22-2005 (ISO 2602:1980) Статистические методы. Статистическое представление данных. Точечная оценка и доверительный интервал для среднего.

⁸ Общая фармакопейная статья 1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Среднее значение активности фактора VIII нативной плазмы определили на уровне $1,46 \pm 0,22$ МЕ/мл (табл. 1), что сопоставимо со значением активности фактора VIII в 70–150% в пуле плазмы здоровых доноров (1 МЕ/мл соответствует 100% активности фактора VIII) [7].

Исходя из полученного среднего значения активности фактора VIII нативной плазмы, среднее изменение состояния (уменьшение активности фактора VIII) Δ_j на всех технологических этапах производства, проведения стрессовых испытаний и контроле качества должно составлять не более 43% для соответствия выбранному условию стабильности $A_j \geq 0,7$ МЕ/мл.

Среднее значение активности фактора VIII не выходило за нижний предел условия стабильности в 0,7 МЕ/мл ($A_j \geq 1$ МЕ/мл во всех опытах). Среднее изменение состояния Δ_j во всех испытаниях не превышало 23%, что соответствует средним значениям снижения активности фактора VIII при долгосрочных испытаниях стабильности на стадиях: хранение с момента начала забора индивидуальной дозы до окончания замораживания при температуре минус 70 °С, хранение при температуре минус 30 °С и ниже в течение 3 месяцев, оттаивание индивидуальной дозы и проведение лабораторного контроля [8]. Это свидетельствует об отсутствии какого-либо значимого влияния заявленных условий стрессовых испытаний на показатель активности фактора VIII.

Полученные данные не дают представления о динамике снижения активности фактора VIII при выбранных для испытаний температурных режимах хранения, поскольку в процессе испытаний не удалось достичь снижения активности фактора за пределы условия стабильности ($A_j \geq 0,7$ МЕ/мл). С учетом изученных свойств плазмы человека для фракционирования при долгосрочных испытаниях стабильности можно предположить о соответствии активности фактора VIII в прошедших испытаниях индивидуальных доз на всем остаточном сроке годности плазмы (три года с даты заготовки) [8].

Таким образом, результаты изучения изменения активности фактора VIII при моделировании отклонений температурного режима хранения и транспортировки от регламентированных норм свидетельствуют о стабильности плазмы человека для фракционирования при выполнении одного из следующих условий:

- температура хранения и транспортировки не поднималась выше минус 5 °С в течение 24 ч с начала выявления отклонения;
- температура хранения и транспортировки не поднималась выше минус 15 °С в течение 48 ч с начала выявления отклонения;
- температура хранения и транспортировки не поднималась выше минус 20 °С в течение 120 ч с начала выявления отклонения.

Полученные результаты позволяют говорить о точном соответствии плазмы человека для фракционирования по показателю активности фактора VIII при отклонениях температурного режима хранения и транспортировки, разрешенных требованиями Европейской фармакопеи⁹.

Выводы

1. В ходе изучения стабильности плазмы человека для фракционирования по показателю активности фактора VIII при моделировании отклонений в температурном режиме хранения и транспортировки (стрессовые испытания стабильности) было установлено отсутствие влияния кратковременных отклонений температурного режима хранения на стабильность

плазмы. Во всех испытаниях было подтверждено соответствие плазмы выбранному условию стабильности.

2. Отсутствие значимого снижения активности фактора VIII в плазме при температуре минус 20 °С в течение 120 ч может являться основанием для внесения изменений в температурный режим транспортировки плазмы человека для фракционирования с температуры минус 30 °С и ниже до минус 20 °С и ниже. Изменение температурного режима позволит пересмотреть жесткие технические требования к холодильным установкам авторефрижераторов и снизит стоимость транспортировки за счет экономии топлива.

3. Полученные результаты позволяют задуматься о целесообразности включения раздела с допустимыми отклонениями температурного режима хранения, разрешенными Европейской фармакопеей, в нормативные документы Российской Федерации на плазму человека для фракционирования. Установленные значения допустимых отклонений послужат инструментом оценки при анализе рисков для качества плазмы с отклонениями в температурном режиме хранения и транспортировки, что позволит снизить финансовые затраты на дополнительные лабораторные исследования.

Вклад авторов. **А. А. Городков** — проведение стрессовых испытаний плазмы человека для фракционирования, написание текста, редактирование и переработка рукописи; **А. Л. Попцов** — анализ полученных результатов испытаний, оформление рукописи, доработка текста; **А. Л. Хохряков** — окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. **Andrey A. Gorodkov**—conducting stress tests of human plasma for fractionation, writing the text, editing and revision of the paper; **Aleksandr L. Poptsov**—analysis of the obtained test results, formatting of the paper, revision of the text; **Aleksandr L. Khokhryakov**—approval of the final version of the paper for publication.

Благодарности. Исследования проводились без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was conducted without sponsorship.

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. Hellstern P, Bach J, Haubelt H, Hitzler WE, Mathis S, Vogt A. The impact of the intensity of serial automated plasmapheresis and the speed of deep-freezing on the quality of plasma. *Transfusion*. 2001;41(12):1601–5. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2001.41121601.x>
2. Runkel S, Haubelt H, Hitzler W, Hellstern P. The quality of plasma collected by automated apheresis and of recovered plasma from leukodepleted whole blood. *Transfusion*. 2005;45(3):427–32. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.04276.x>
3. Burnouf T, Kappelsberger C, Frank K, Burkhardt T. Protein composition and activation markers in plasma collected by three apheresis procedures. *Transfusion*. 2003;43(9):1223–9. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2003.00505.x>
4. Swärd-Nilsson A-M, Persson P-O, Johnson U, Lethagen S. Factors influencing factor VIII activity in frozen plasma. *Vox Sang*. 2006;90(1):33–9. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2005.00715.x>

⁹ Human plasma for fractionation. European Pharmacopoeia. 10th ed.

5. Cardigan R, Van der Meer PF, Pergande C, Cookson P, Baumann-Baretti B, Cancelas JA, et al. Coagulation factor content of plasma produced from whole blood stored for 24 hours at ambient temperature: results from an international multicenter BEST Collaborative study. *Transfusion*. 2011;51(Suppl 1):50S–7S. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02963.x>
6. Попцов АЛ, Злыгостева СЮ, Парамонов ИВ, Тхай СВ. Верификация методики определения активности фактора VIII хромогенным методом в плазме для фракционирования. *Вестник службы крови России*. 2012;2:32–4. [Poptsov AL, Zlygosteva SYu, Paramonov IV, Tkhaiy SV. Verification procedures for determination of the factor VIII activity by chromogenic method in plasma for fractionation. *Vestnik sluzby krovi Rossii = Bulletin of the Russian Blood Service*. 2012;2:32–4 (In Russ.)]
7. Волкова СА, Боровков НН. Основы клинической гематологии. Учебное пособие. Н. Новгород: НижГМА; 2013. [Volkova SA, Borovkov NN. *Basics of Clinical Haematology*. Study guide. Nizhny Novgorod: NizhGMA; 2013 (In Russ.)]
8. Парамонов ИВ, Попцов АЛ, Городков АА, Лиманская ЕП. Изучение стабильности фактора VIII при хранении плазмы для фракционирования. *Вестник службы крови России*. 2015;3:61–3. [Paramonov IV, Poptsov AL, Gorodkov AA, Limanskaya EP. The study of the stability of factor VIII during storage of plasma for fractionation. *Vestnik sluzby krovi Rossii = Bulletin of the Russian Blood Service*. 2015;3:61–3 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Городков Андрей Алексеевич. Andrey A. Gorodkov. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6981-9987>

Попцов Александр Леонидович, канд. мед. наук. Aleksandr L. Poptsov, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4904-0287>

Хохряков Александр Львович. Aleksandr L. Khokhryakov. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8436-3711>

Поступила 02.04.2020

После доработки 17.08.2020

Принята к публикации 28.08.2020

Received 2 April 2020

Revised 17 August 2020

Accepted 28 August 2020



Светлана Михайловна Суханова (к 60-летию со дня рождения)

Svetlana Mikhaylovna Sukhanova (on the 60th Anniversary)

5 августа 2020 года исполнилось 60 лет со дня рождения кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника, начальника лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Светланы Михайловны Сухановой.

С. М. Суханова родилась в 1960 году в г. Ташкенте в семье военнослужащего. В 1983 году окончила биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова по специальности «Биохимия». После окончания университета трудовую деятельность Светлана Михайловна начала в Институте медико-биологических проблем Минздрава СССР. С 1985 по 1997 год работала в Научном центре медицинской биотехнологии, пройдя путь от старшего лаборанта до ученого секретаря Центра.

В 1991 году успешно защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему «Получение и применение фактора роста фибробластов при бессывороточном культивировании клеток — продуцентов урокиназы» по специальности «Биотехнология». В 1997 году ей было присвоено ученое звание старшего научного сотрудника.

С 1997 года Светлана Михайловна работала в ГИСК им. Л. А. Тарасевича в лаборатории бактериологических питательных сред в должностях старшего научного сотрудника и заведующего этой же лабораторией. Являясь высококвалифицированным специалистом по проблеме качества питательных сред, используемых в медицинской и санитарной бактериологии, С. М. Суханова занималась вопросами стандартизации и совершенствования методов оценки качества бактериологических питательных сред и курировала ведущие отечественные предприятия по производству более 200 наименований питательных сред.

После присоединения ГИСК им. Л. А. Тарасевича к ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России с 2011 года и по настоящее время С. М. Суханова возглавляет лабораторию бактериологических питательных сред и культур клеток и продолжает работу по разработке системы требований к питательным средам, используемым для оценки качества лекарственных средств. Под руководством С. М. Сухановой лаборатория, помимо производственной деятельности, связанной с подготовкой и контролем качества питательных сред, осуществляет предрегистрационную экспертизу и подтверждение микробиологической безопасности всего спектра биологических лекарственных препаратов, а также соответствия физико-химических показателей качества растворителей.

Результатом научно-исследовательской работы С. М. Сухановой по совершенствованию экспертной оценки микробиологической безопасности биологических препаратов и повышению эффективности методов выявления контаминации бактериями, грибами и микоплазмами стало обновление действующих стандартов и разработка нового национального фармакопейного стандарта «Питательные среды».

Светланой Михайловной лично и в соавторстве опубликовано более 70 научных и научно-методических работ в области биохимии, клеточной биологии, биотехнологии и микробиологии, в том числе руководства, фармакопейные стандарты, методические указания и патенты на изобретения Российской Федерации.

С. М. Суханова награждена нагрудным знаком «Отличник здравоохранения», Почетной грамотой и Благодарностью Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Сердечно поздравляем Светлану Михайловну с юбилеем! Желаем крепкого здоровья, успехов во всех начинаниях, счастья и семейного благополучия!

Вадим Анатольевич Меркулов (к 50-летию со дня рождения)

Vadim Anatol'evich Merkulov (on the 50th Anniversary)



8 августа 2020 года исполнилось 50 лет со дня рождения доктора медицинских наук, профессора, заместителя генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Вадима Анатольевича Меркулова.

В. А. Меркулов родился в 1970 году в г. Брянске. В 1994 году окончил Смоленский государственный медицинский институт по специальности «Педиатрия» (специализация – детская хирургия).

В период с 1994 по 2012 год В. А. Меркулов проходил военную службу в Вирусологическом центре ФГУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Сергиев Посад Московской обл.). Там он последовательно прошел путь от младшего научного сотрудника до заместителя начальника центра по научной работе. Ему было присвоено воинское звание полковника медицинской службы.

В 1999 году В. А. Меркулов защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата наук, а в 2007 году — диссертацию на соискание ученой степени доктора медицинских наук, посвященную проблеме молекулярной диагностики опасных и особо опасных инфекционных заболеваний. В 2010 году В. А. Меркулову было присвоено ученое звание профессора по специальности «Молекулярная биология».

С 2010 года В. А. Меркулов работает в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в должности первого заместителя генерального директора, а с 2015 года — в должности заместителя генерального директора по экспертизе лекарственных средств.

С 2008 года В. А. Меркулов, занимаясь по совместительству научно-педагогической деятельностью, преподавал в Российском национальном исследовательском медицинском университете им. Н. И. Пирогова в должности профессора кафедры медицинских нанобиотехнологий, а с 2017 года и по настоящее время преподает в Первом Московском государственном медицинском университете им. И. М. Сеченова в должности профессора кафедры фармакологии Института фармации.

В. А. Меркулов — высококвалифицированный специалист по проблемам молекулярной биологии, молекулярной генетики, иммунологии, вирусологии и экспертизы лекарственных средств с целью их государственной регистрации. В составе мобильных диагностических групп В. А. Меркулов выполнял задачи по выявлению причин вспышек неясных инфекционных

заболеваний. В 1999 году Вадим Анатольевич в полевых условиях выявил возбудителя Конго-Крымской геморрагической лихорадки, что позволило установить причину вспышки и оперативно принять меры по предотвращению распространения эпидемии опасной инфекции, за что был награжден орденом Мужества. В 2020 году лично принимал участие в разработке методических требований проведения доклинических и клинических исследований лекарственных препаратов для лечения коронавирусной инфекции (COVID-19) у людей.

В. А. Меркулов является членом комиссии Экспертного совета РАН по модернизации и инновационному развитию медицинской науки в области нанобиотехнологий и членом Проблемной комиссии № 32.06 «Клиническая фармакология» Научного совета по фармакологии № 32 РАН. В. А. Меркулов — заместитель главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», а также член редакционных коллегий и редакционных советов ряда других научных журналов.

Под руководством В. А. Меркулова были подготовлены и успешно защищены 9 диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и 1 — на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук.

В. А. Меркуловым лично и в соавторстве опубликовано более 300 научных работ, включая руководства, учебные пособия, а также патенты на изобретения Российской Федерации в области разработки медицинских средств защиты.

В. А. Меркулов награжден орденом Мужества (1999), медалями ордена «За заслуги перед Отечеством» I и II степени (2006, 2005), является лауреатом премии министра обороны за вклад в обеспечение биологической безопасности населения Российской Федерации (2008), медалью «За отличие в военной службе» I и II степени (2010, 2005), медалью «Гиппократ» (2014) и другими наградами.

Указом Президента Российской Федерации от 21 июня 2020 года № 407 за большой вклад в борьбу с коронавирусной инфекцией (COVID-19), самоотверженность и высокий профессионализм, проявленные при исполнении врачебного долга, В. А. Меркулов награжден орденом Пирогова.

Сердечно поздравляем Вадима Анатольевича с юбилеем! Желаем дальнейших успехов в области сохранения и укрепления здоровья граждан Российской Федерации!



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) — Т57941



ISSN 2221-996X



9 772221 996004