

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

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

Том 17, № **4**
Октябрь – декабрь 2017



ISSN 2221-996X



9 772221 996004

Сравнительный анализ использования цельноклеточных и бесклеточных
коклюшных вакцин для профилактики коклюшной инфекции

Экстракт цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*)
в качестве адъюванта при интраназальной иммунизации мышей
гриппозными антигенами



Л. А. Тарасевич

Учредитель

Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы
средств медицинского
применения»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Издатель

Издательский дом «Фолиум»

Главный редактор

Олефир Ю. В.

Заместители**главного редактора**

Меркулов В. А.

Бондарев В. П.

Ответственный секретарь

Климов В. И.

Научный редактор

Лебединская Е. В.

Редактор

Шестакова А. П.

Члены редколлегии

Авдеева Ж. И.

Балаболкин И. И.

Борисевич И. В.

Воробьева М. С.

Гущин И. С.

Дармов И. В.

Иванов В. Б.

Игнатьев Г. М.

Леви Д. Т.

Медуницын Н. В.

Мовсесянц А. А.

Мосягин В. Д.

Хамитов Р. А.

Редакционный совет

Амвросьева Т. В. (Беларусь)

Борисевич С. В. (Сергиев Посад)

Брико Н. И. (Москва)

Волчков В. Е. (Франция)

Гинцбург А. Л. (Москва)

Дятлов И. А. (Оболensk)

Зверев В. В. (Москва)

Кутырев В. В. (Саратов)

Львов Д. К. (Москва)

Михайлов М. И. (Москва)

Покровский В. И. (Москва)

Савченко В. Г. (Москва)

Учайкин В. Ф. (Москва)

Хайтов Р. М. (Москва)

Чумаков К. М. (США)

СОДЕРЖАНИЕ**Обзоры****Культуры клеток в заместительной терапии**

Е. М. Петручук, Н. В. Шалунова, Ю. В. Олефир, И. В. Борисевич, В. В. Перекрест,
В. А. Шевцов, А. В. Рукавишников, Л. М. Хантимирова.

197

Сравнительный анализ использования цельноклеточных и бесклеточных

коклюшных вакцин для профилактики коклюшной инфекции

И. А. Алексеева, О. В. Перелыгина.

207

Основные подходы к управлению данными для администрирования биологических

коллекций

Д. С. Давыдов, К. А. Кошечкин, А. А. Мовсесянц

216

Международный опыт стандартизации препаратов аллергенов

Л. В. Невская, Е. И. Лавренчик, М. Ю. Жданова, О. В. Фадейкина, В. К. Капитанова

222

Анализ стабильности показателей качества биологических лекарственных препаратов

при проведении испытаний в рамках подтверждения соответствия

Д. С. Давыдов.

230

Оригинальные статьи**Экстракт цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве адъюванта**

при интраназальной иммунизации мышей гриппозными антигенами

А. С. Гудымо, С. В. Мальцев, В. А. Евсеев, Н. В. Данильченко, В. Ю. Марченко,
А. Г. Дурыманов, А. Б. Рыжиков

233

Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной живой

И. В. Касина, С. А. Алексеева, Э. Е. Бердникова, Т. И. Немировская, А. С. Алехина

240

Аттестация отраслевого стандартного образца содержания антиальфафастифолизина

и некоторые аспекты его практического применения

Е. А. Хуснатдинова, Е. С. Коновалова, О. В. Фадейкина, Р. А. Волкова, Н. И. Кишкурно,
Э. Ю. Кудашева, Д. В. Шведов

248

Исследование защитного действия туберкулезных вакцин в эксперименте

Д. Т. Леви, Н. В. Александрова, Е. В. Лебединская, А. В. Наконечная

253

Хроника

Пауза Асхатовна Волкова (к 70-летию со дня рождения)

258

Адрес редакции:

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 127051, Российская Федерация, Москва,

Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.

Тел.: +7 495 234-61-04, +7 495 214-91-19 (доб. 63-35; 63-36). E-mail: biopreparaty@expmed.ru.

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации средства
массовой информации ПИ № ФС77-53128 от 14 марта 2013 г.

Все права защищены. Любое воспроизведение опубликованных материалов без письменного со-
гласия редакции не допускается. При перепечатке ссылка на журнал обязательна.

Журнал включен в наукометрическую базу данных Science Index.

Подписано в печать 30.11.2017.

Подписной индекс **25120**

в каталоге «Газеты. Журналы» агентства «Роспечать».

Выходит один раз в три месяца.

Дизайн, верстка, печать: Издательский дом «Фолиум»





L. A. Tarasevich

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

Founder

Federal State Budgetary
Institution «Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal
Products» of the Ministry of Health
of the Russian Federation

Publisher

Folium Publishing Company

Editor-in-Chief

Olefir Yu. V.

Deputy Editor-in-Chief

Merkulov V. A.
Bondarev V. P.

Executive Secretary

Klimov V. I.

Science Editor

Lebedinskaya E. V.

Editor

Shestakova A. P.

Editorial Board

Avdeeva Zh. I.
Balabolkin I. I.
Borisevich I. V.
Darmov I. V.
Gouschin I. S.
Ivanov V. B.
Ignatiev G. M.
Khamitov R. A.
Levi D. T.
Medunitsyn N. V.
Movsesyants A. A.
Mosyagin V. D.
Vorobieva M. S.

Editorial Council

Amvrosieva T. V. (Belarus)
Borisevich S. V. (Sergiev Posad)
Briko N. I. (Moscow)
Volchikov V. E. (France)
Gintsburg A. L. (Moscow)
Dyatlov I. A. (Obolensk)
Zverev V. V. (Moscow)
Kutyrev V. V. (Saratov)
Lvov D. K. (Moscow)
Mikhailov M. I. (Moscow)
Pokrovskiy V. I. (Moscow)
Savchenko V. G. (Moscow)
Uchaikin V. F. (Moscow)
Khaltov R. M. (Moscow)
Chumakov K. M. (USA)

CONTENTS

Reviews

- Cell cultures in replacement therapy**
E. M. Petruchuk, N. V. Shalunova, Yu. V. Olefir, I. V. Borisevich, V. V. Perekrest,
V. A. Shevtsov, A. V. Rukavishnikov, L. M. Khantimirova 197
- Comparative analysis of whole-cell and acellular pertussis vaccines efficacy
in preventing pertussis**
I. A. Alekseeva, O. V. Pereyagina 207
- Basic approaches to data management for administration of biological collections**
D. S. Davydov, K. A. Koshechkin, A. A. Movsesyants 216
- International practice of allergen products standardization**
L. V. Nevskaya, E. I. Lavrenchik, M. Yu. Zhdanova, O. V. Fadeykina, V. K. Kapitanova 222
- Trend analysis of batch to batch consistency during quality assessment
of biological medicinal products**
D. S. Davydov 230

Original Articles

- Cyclamen europaeum (*Cyclamen purpurascens*) extract as adjuvant for nasal immunization
of mice with influenza antigens**
A. S. Gudymo, S. V. Maltsev, V. A. Evseenko, N. V. Danilchenko, V. Y. Marchenko,
A. G. Durymanov, A. B. Ryzhikov 233
- Prospects for improving evaluation of live tularemia vaccine quality**
I. V. Kasina, S. A. Alekseeva, Z. E. Berdnikova, T. I. Nemirovskaya, A. S. Alekhina 240
- Certification of the branch standard sample of anti-alpha-staphylolysin content,
and some aspects of its use**
E. A. Khushnatdinova, E. S. Konovalova, O. V. Fadeykina, R. A. Volkova, N. I. Kishkurno,
E. Yu. Kudasheva, D. V. Shvedov 248
- Experimental study of the protective effect of tuberculosis vaccines**
D. T. Levy, N. V. Aleksandrova, E. V. Lebedinskaya, A. V. Nakonechnaya 253
- Chronicle**
Rauza Askhatovna Volkova (on the 70th anniversary) 258

Address of the Editorial Office:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal
Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2,
Moscow 127051, Russian Federation. Tel.: +7 495 234-61-04, +7 495 214-91-19 (ext. 63-35; 63-36).
E-mail: biopreparaty@expmed.ru.

Publication is registered by the Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom,
Information Technologies and Mass Communications. Certification of the Mass Media
Registration PI No. ФС77-53128 of March 14, 2013.

All rights reserved. No part of this publication may be used or reproduced
in any form or by any means without the prior written permission of the Publishers.
Reproducing any part of this material a reference to the journal is obligatory.

The publication data for the journal is November 30, 2017.

Publication is once every 3 months.

CRC preparation and printing: Folium Publishing Company.



Культуры клеток в заместительной терапии

Е. М. Петручук, Н. В. Шалунова, Ю. В. Олефир, И. В. Борисевич, В. В. Перекрест,
В. А. Шевцов, А. В. Рукавишников, Л. М. Хантимирова

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

Поступила 27.06.2017 г. Принята к публикации 04.07.2017 г.

Клеточная заместительная терапия — одно из приоритетных направлений современной медицины, цель которого состоит в восстановлении структуры и функций поврежденных тканей путем трансплантации клеток, выращенных в условиях *in vitro*. В статье отражены обобщенные данные исследований по практическому применению диплоидных клеточных линий (аллогенных фибробластов) в заместительной терапии в различных областях медицины в рамках применения новых медицинских технологий. Описаны преимущества применения фибробластов и способы введения клеточной культуры в организм человека. В настоящее время применение медицинских средств, содержащих жизнеспособные клетки человека — биомедицинских клеточных продуктов, регулируется 180-ФЗ от 23.06.2016 г. «О биомедицинских клеточных продуктах». Клеточные культуры, входящие в состав БМКП, должны представлять собой морфологически однородную популяцию клеток определенного тканевого происхождения с ограниченным сроком жизни, стабильным кариотипом (не менее 75 % клеток должны иметь двойной набор хромосом), быть онкогенно безопасными, свободными от присутствия посторонних агентов, иметь низкую экспрессию антигенов гистосовместимости. В соответствии с 180-ФЗ, все характеристики клеточной линии, входящей в состав БМКП, подтверждающие качество, должны быть отражены в спецификации на БМКП. До принятия 180-ФЗ необходимым условием при использовании клеточных культур в клинической практике являлось наличие паспорта. Терапевтический потенциал фибробластов, связанный с оптимизацией течения репаративных процессов, повышением регенеративных и адаптивных возможностей организма, а также накопленный опыт их клинического применения в рамках медицинских технологий, обуславливает интерес к разработке БМКП на основе фибробластов и их применению в заместительной терапии. Однако, следует отметить, что в составе БМКП согласно 180-ФЗ не может быть использован «биологический материал, полученный путем прерывания процесса развития эмбриона или плода человека или нарушения такого процесса».

Ключевые слова: клеточные культуры; диплоидные клетки; аутофибробласты; аллофибробласты; трансплантация клеток; трансплантация тканей, биомедицинские клеточные продукты.

Библиографическое описание: Петручук ЕМ, Шалунова НВ, Олефир ЮВ, Борисевич ИВ, Перекрест ВВ, Шевцов ВА, Рукавишников АВ, Хантимирова ЛМ. Культуры клеток в заместительной терапии. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(4): 197–206.

Эффективное восстановление структуры и функций поврежденных органов и тканей — одна из актуальных проблем современной заместительной терапии. Перспективным направлением решения этой проблемы является использование биомедицинских технологий. Одними из современных тенденций развития клеточной заместительной терапии являются исследования в области длительно культивируемых клеток в системе *in vitro*. Источником клеточных культур могут быть эмбрионы и ткани взрослых животных и человека. Об актуальности применения клеточных культур человека в терапевтических целях свидетельствует и принятие нового 180-ФЗ от 23.06.2016 г. «О биомедицинских клеточных продуктах». Однако, следует отметить, что в составе БМКП, согласно 180-ФЗ, не может быть использован ксеногенный биологический материал и «биологический материал, полученный путем прерывания процесса развития эмбриона или плода человека или нарушения такого процесса».

Целью настоящей работы является анализ опыта и перспектив использования диплоидных клеточных линий в заместительной терапии, а также рассмотрение вопросов, касающихся требований и методов, подтверждающих качество клеточных линий, входящих в состав биомедицинских клеточных продуктов.

Изучение фибробластов

Впервые возможность выращивания клеток кожи, в частности, кератиноцитов *in vitro* была показана в исследованиях Р. В. Medawar [1, 2]. Большой вклад в разработку методов культивирования клеток внесли отечественные ученые А. А. Максимов, А. В. Румянцев, А. Д. Тимофеевский, Н. Г. Хлопин, Г. К. Хрущов [3–7]. Широкому распространению методов клеточных культур способствовало получение линий клеток из единичных фибробластов, растущих на стекле *in vitro* неопределенно долгое время, и разработка питательных сред для их культивирования [8–10].

Культивирование клеток *in vitro* — это выращивание отдельных клеток в оптимальных для данного типа условиях (температуры, состава газовой среды, соотношения питательных веществ и стимуляторов роста). Длительность пассирования и интенсивность роста клеток в культуре зависят от возраста организма, от которого получена клеточная линия. Эмбриональные ткани легко перевиваются *in vitro*, давая хороший прирост биомассы, в то время как получение линий клеток от взрослых организмов требует значительных усилий [1–3, 11]. Некоторые типы клеток нормальных тканей достаточно легко размножаются *in vitro*, в основном это миобласты, клетки эндотелия и

фибробласты. Фибробласты — основные клетки соединительной ткани, имеющие мезенхимальное происхождение и округлую, удлинённую или веретенообразную форму с отростками и плоским овальным ядром [12, 13].

В 1961 г. L. Hayflick и P. S. Moorhead представили данные о том, что даже в идеальных условиях культивирования фибробласты эмбриона человека способны делиться только ограниченное число раз (50 ± 10). Было установлено, что при пересевах в условиях *in vitro* клетки проходят шесть морфологически различных стадий: лаг-фазу, фазу ускоренного роста, логарифмическую фазу роста, фазу замедленного роста, стационарную фазу, фазу гибели клеток, после чего их способность к пролиферации исчерпывается. Последняя фаза жизни клеток в культуре была определена как клеточное старение, а сам феномен получил название «лимит Хейфлика» (по имени автора). Исключения составляют опухолевые клетки, способные к неограниченному росту [14].

Терапевтический эффект фибробластов

Сохранение диплоидного кариотипа фибробластов человека при культивировании в условиях *in vitro*, ограниченная продолжительность жизни, низкая экспрессия антигенов гистосовместимости, отсутствие онкогенных и туморогенных потенциалов позволило использовать их для терапевтических целей. Было показано, что фибробласты при нанесении на поврежденные участки кожи оказывают непосредственное влияние на заживление и эпителизацию ран [15, 16].

Для практического применения клетки подразделяют на аутологичные (собственные клетки организма) и аллогенные (клетки, получаемые из организма других людей). Аутологичные клетки получают из тканей конкретного человека и ему же затем трансплантируют, в то время как аллогенные клетки получают у совместимого донора и затем вводят реципиенту. Аутологичные клетки не подвергаются реакции отторжения трансплантата и не опасны по сравнению с аллогенными в связи с вероятным переносом последними контаминирующих агентов. Это делает возможным применение трансплантации клеток без приме-

нения иммуносупрессорной терапии [17]. Сравнение преимуществ и недостатков применения аутологичных и аллогенных фибробластов приведено в таблице 1.

Несмотря на ряд ограничений использования аллогенных клеток, в США и других странах мира, включая Россию, проводятся масштабные научные исследования, при этом объем использования аллогенных клеток превалирует над аутологичными [18].

Использование фибробластов в качестве лечебного препарата обусловлено их способностью ускорять механизмы регенерации и пролиферации за счет вырабатываемых ими следующих факторов:

- основной фактор роста фибробластов (β -FGF) влияет на рост всех типов клеток в ране, стимулирует продукцию внеклеточного матрикса (коллаген, эластин, фибронектин);
- β -трансформирующий фактор роста (β -TGF) стимулирует хемотаксис фибробластов и выработку новых волокон коллагена, эластина и фибронектина;
- эпидермальный фактор роста (EGF) ускоряет заживление и эпителизацию ран;
- фактор роста кератиноцитов (KGF) ускоряет пролиферацию и эпителизацию ран;
- α -трансформирующий фактор роста (α -TGF) активно влияет на ангиогенез [13].

В клинической практике в зависимости от поражения используются различные способы введения клеточной культуры в организм человека: аппликационный, внутримышечный, внутрисосудистый и внутриорганный. Рядом авторов при лечении раневых дефектов кожного покрова предложено применение культуры аллофибробластов при помощи аэрозольного нанесения [19–21].

Трансплантация клеточных продуктов осуществляется с помощью нативных клеток или используются носители естественного и искусственного происхождения. К качеству носителей предъявляется ряд требований: нетоксичность, биodeградируемость, механическая прочность, а также способность выращенных клеток к пролиферации и дифференцировке на их поверхности. Ряд исследователей считают необходимым использование синтетических

Таблица 1. Преимущества и недостатки использования аутологичных и аллогенных фибробластов

Культура клеток	Преимущества	Недостатки
Аутологичные фибробласты	• при применении наблюдается длительный клинический эффект; • исключен риск заражения пациента инфекционными агентами (ВИЧ, гепатит В и др.); • исключен риск развития аллергических реакций; • не возникает трудностей с поиском подходящих доноров; • не подвергаются реакции отторжения трансплантата; • для получения клеток биопсию кожи можно проводить неоднократно	• для получения достаточного количества клеточного материала необходимо 3–6 недель
Аллогенные фибробласты	• при применении обеспечивается быстрая эпителизация раневой поверхности и своевременное восстановление целостности кожного покрова; • для выращивания клеток необходимо 3–4 сут; • клетки могут быть предварительно наработаны и заморожены в больших количествах и доступны практически для немедленного применения; • возможность создания банков охарактеризованных клеток; • невысокая стоимость	• пересадка аллоклеток может привести к сенсибилизации организма чужеродными антигенами; • нельзя гарантировать отсутствие у донора тяжелых инфекционных заболеваний; • жизненный срок аллогенных фибробластов в трансплантате ограничен

носителей, другие авторы предлагают использовать биологические носители [22–24].

Опыт клинического применения фибробластов в России

В России биотехнология клеточных культур получила развитие в ряде учреждений здравоохранения и научно-исследовательских институтах: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, ФГБУ «Институт хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» и др.

В 1983 г. в Институте хирургии им. А. В. Вишневского впервые в мировой медицинской практике была организована лаборатория по культивированию клеток человека в прикладных целях. В лаборатории был разработан и внедрен в клиническую практику метод лечения обширных ожоговых ран, основанный на использовании культуры аллогенных фибробластов; использовались методы лечения обширных термических ожогов кожных покровов, при которых отмечалась недостаточность донорских участков кожи для аутодермопластики.

В 1989 г. В. П. Туманов с соавторами сообщили о применении культивированных аллофибробластов в лечении длительно незаживающих донорских ран [17]. Предпосылкой этому стали предшествовавшие фундаментальные исследования, показавшие ключевую роль фибробластов в регенеративных процессах. Преимуществами метода являлись небольшие сроки культивирования аллофибробластов (3 суток), хорошее приживление трансплантатов (в среднем 97 %), возможность создания банков клеток, относительно небольшая себестоимость. В отечественных и зарубежных изданиях были опубликованы обобщенные данные большого количества клинических исследований по использованию культуры фибробластов человека у пациентов с обширными ожогами. Показано, что после безуспешного применения практически всех традиционных методов терапии длительно незаживающих донорских ран продолжительность лечения которых составляет в среднем 50–60 суток, трансплантация культивированных аллофибробластов приводила к эпителизации уже через 6–8 суток. Кроме того, появление дополнительной донорской раневой поверхности, существующей до 12–14 суток и более на фоне тяжелого состояния больного с обширными ожогами, не может не отразиться на течении ожоговой болезни в послеоперационном периоде [25–28].

Культура фибробластов, выращенная на биосовместимой лавсановой пленке со сквозными порами Фолидерм (ООО «Фолиум», Россия), применялась в комплексном лечении трофических язв, обусловленных варикозной болезнью и посттромбофлебитическим синдромом. Сроки эпителизации составили в среднем 1,5 недели для вари-

козных и 3,2 недели для посттромбофлебитических язв, в то время как в контрольной группе при использовании хирургических и консервативных методов заживление язв наблюдалось у 82 % пациентов в течение 3,6–3,9 месяцев. Сообщалось о значительном сокращении у больных сроков заживления трофических язв после комплексного применения радиочастотной некрэктомии и имплантации аллофибробластов [29–31].

Одной из наиболее актуальных проблем в оториноларингологии остается лечение острых и хронических ран, восстановление слуха при травматическом разрыве барабанной перепонки. Разработан и апробирован в клинической оториноларингологии способ трансплантации культивированных аллофибробластов человека, позволяющий закрывать поврежденную перфорацию барабанной перепонки. Суть способа применения заключается в следующем: после деэпителизации на края перфорации помещается кусочек прозрачной полимерной пленки соответствующего размера с нанесенной на нее культурой аллофибробластов человека, во время операции восстанавливается слух и в течение последующих 12–14 суток происходит активная регенерация барабанной перепонки без рубцовых деформаций. В результате лечения аллофибробластами предотвращается повторное инфицирование барабанной полости. Кроме того, метод прост в применении, малотравматичен и эффективен в 92 % случаев [32, 33].

Лечение больных с рецидивирующими и персистирующими эрозиями роговицы, в том числе послеожоговыми, является актуальной проблемой в офтальмологии. Предложен способ лечения эрозии роговицы, основанный на применении многослойного пласта аллогенных эпителиальных клеток, выращенных на внутренней поверхности контактной линзы, используемой с одной стороны в качестве матрицы и носителя клеток, а с другой — в качестве способа фиксации трансплантата [34]. Был предложен оригинальный метод лечения хронического пародонтита при использовании культивированных фибробластов человека на плодной твердой мозговой оболочке (ТМО). На основании экспериментальных и клинических данных было показано, что при применении ТМО с аллофибробластами для лечения хронического пародонтита средней и тяжелой степени процессы регенерации костных тканей и пародонта происходят более интенсивно, чем при имплантации синтетических материалов. Преимущество данного способа лечения заключается в том, что в раневом ложе при имплантации ТМО и аллофибробластов не происходит биодеградации плодного материала и культивированных аллофибробластов, а имплантат встраивается в костный дефект и трансформируется в дальнейшем в грубоволокнистую костную ткань альвеолярных отростков [35–37].

Опубликованы многочисленные исследования о возможности применения фетальных фибробластов для восстановительной терапии в косметологии. Как и во всех органах и тканях человеческого организма, в коже происходят возрастные изменения в течение жизни. Одной из основных причин старения кожи является снижение пролиферативной активности фибробластов, особенно быстро утрачивается способность к синтезу межклеточного вещества. Поэтому в стареющей коже уменьшаются содержание влаги, толщина дермы, снижается ее тургор, упругость и эластичность. Кожа истончается, растягивается, появляются сосудистые звездочки, пигментные пятна, морщины и складки. Через 6 месяцев после интрадер-

мального введения аутологичных фибробластов повышается толщина и упругость кожи, улучшается ее текстура, уменьшается количество и глубина морщин. В микроструктуре дермы усиливается активность кровотока, увеличивается объем и гидратация межклеточного матрикса, происходит стимуляция выработки собственного коллагена [38–40].

В 60-х годах прошлого века из кожно-мышечной ткани и легкого эмбриона человека были получены диплоидные клеточные линии (или диплоидные фибробласты человека) (ДКЛ). С развитием технологий получения ДКЛ стало возможным создание банков и сохранение клеток при низких температурах в замороженном состоянии в течение многих десятилетий, описание их характеристик, проведение всесторонних испытаний размороженных клеток перед их использованием на отсутствие посторонних агентов, онкогенного и туморогенного потенциалов.

Требования к качеству клеточных линий, предназначенных для применения у человека

Диплоидные клетки человека продолжают использоваться многими производителями в качестве субстратов для производства вакцин, безопасность и эффективность которых подтверждается данными многолетних исследований [41–43].

Клеточные культуры, применяемые для терапии людей с различной патологией, отличаются от клеточных линий, используемых в качестве субстратов для приготовления иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) по составу и предполагаемому механизму действия. Клеточные культуры для лечения людей должны представлять собой морфологически однородную популяцию клеток определенного тканевого происхождения с ограниченным сроком жизни, стабильным кариотипом (не менее 75 % клеток должны иметь двойной набор хромосом), быть онкогенно безопасными, свободными от присутствия посторонних агентов, иметь низкую экспрессию антигенов гистосовместимости.

Большое значение при изучении стабильности клеточных линий имеет поддержание необходимого уровня и особенностей дифференцировки, изменения кариотипа клеток (характеристика числа, размеров, структуры хромосом в процессе пассирования). Для применения ДКЛ необходимо изучение жизнеспособности линии, времени становления, активного роста и дегенерации. В качестве более доступного метода видовой идентификации клеточных культур и выявления возможной контаминации клетками иного видового происхождения применяют метод мультиплексной ПЦР с видоспецифическими праймерами.

Исходные ДКЛ должны быть получены из официальных коллекций, охарактеризованы в соответствии с национальными и международными требованиями и разрешены к применению для производства препаратов, вводимых людям в установленном порядке [44–46]. В связи с особенностями препарата, источником получения стерильных клеток, небольшим объемом серий, коротким сроком годности, особенностями хранения необходимо проводить детальное изучение методов его аттестации. Требования к качеству препарата должны охватывать все стадии жизненного цикла клеточной линии и представлять собой комплексную систему ее оценки, начиная с донора, времени, метода и способа получения. Следует оце-

нивать как производственный процесс, так и обеспечение стабильности характеристик [47].

В. П. Туманов с соавторами в обзоре по разработке и применению клеточных технологий в клинической практике в течение 30 лет приводит следующую форму паспорта клеточной культуры:

1. Происхождение и история клеточной культуры:
 - лаборатория, культивировавшая клетки;
 - сведения о культуре (ткань или орган, из которых приготовлена линия);
 - сведения о доноре (этническое, географическое происхождение, пол; при использовании фибробластов обязательно указание возраста донора).
2. История культивирования:
 - ссылки на метод выделения и культивирования;
 - описание оборудования и средств для культивирования;
 - состав сред (в том числе сыворотки, ферменты, гидролизаты; обязательно сопроводительные документы на используемое сырье);
 - физические и химические методы, использованные в процессе культивирования;
 - пассажы (количество пассажей).
3. Идентификация клеточной культуры (тесты могут быть выбраны произвольно):
 - морфологический анализ (субстрат культивирования, специфические маркеры, специфические антитела, генетический полиморфизм или другие генетические тесты);
 - анализ чистоты клеточной культуры (тесты могут быть выбраны произвольно): стерильность, присутствие микоплазм, посторонних вирусов.
4. Стабильность культуры:
 - сроки и условия наработки, хранения;
 - метод криоконсервации.

Разработанный паспорт клеточной культуры — аналог паспорта, принятого в Европе и США, необходимый в современных условиях применения клеточных культур в клинической практике [17], а также во многом согласуется с содержанием спецификации на БМКП [Приказ Министерства здравоохранения РФ от 19 января 2017 г. № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт»].

Для сравнения приводим форму паспорта на диплоидную клеточную культуру, в котором отражены требования для перевиваемых клеток — субстратов иммунобиологических препаратов, в том числе полученных из эмбриональной ткани, а также определяет требования и методы, подтверждающие качество клеточных линий:

1. Наименование линии;
2. Шифр коллекционный;
3. Происхождение;
4. История получения (кем и когда получена клеточная линия, сведения о доноре);
5. Коллекция;
6. Морфология;
7. Способ культивирования;
8. Среда для культивирования;
9. Посевная концентрация (количество клеток в 1 мл);
10. Метод снятия (0,25 % трипсин, 0,02 % раствор Версена);
11. Кратность посева;
12. Частота пассирования;
13. Условия криоконсервации (питательная среда, фетальная бычья сыворотка);

14. Номер пассажа в жидком азоте;
15. Жизнеспособность после криоконсервации (в процентах);
16. Контроль контаминации (наличие бактерий, грибов, микоплазм и вирусов);
17. Видовая идентичность (методы определения спектра изоферментов, кариологический анализ хромосом, ПЦР в реальном времени);
18. Кариология (стабильность кариотипа, межвидовая идентификация клеток);
19. Стабильность биологических свойств (количество рекомендованных для производства пассажей);
20. Область применения, чувствительность к производственному штамму вируса (или способность продуцировать биологически активное вещество) [45].

Опыт ГИСК им. Л. А. Тарасевича в аттестации диплоидных клеточных линий

В течение многих лет в специализированной лаборатории ГИСК им. Л. А. Тарасевича проводилась аттестация диплоидных клеточных линий человека и животных, представленных рядом производственных и научных учреждений страны в виде главного и рабочего банков. Комплексное изучение вновь установленных перевиваемых клеточных линий необходимо для их аттестации в качестве возможных субстратов для производства и контроля иммунологических лекарственных препаратов.

В соответствии с научной программой проводилась аттестация представленных авторами диплоидных клеточных линий (М-22, ЛЭЧ-4(81), Л-68, ФЭЧ-16-1 и ФЭЧ-16-2). Изучались культуральные, морфологические свойства клеток, их онкогенные потенции, чувствительность к некоторым вирусам, определялась их видовая идентичность, отсутствие контаминантов. ДКЛ с успехом культивировались на отечественных питательных средах с добавлением фетальной бычьей сыворотки. Определение жизненного цикла диплоидных линий показало, что клетки оставались способными к субкультивированию в зависимости от фазы роста. В фазе активного роста все культуры были представлены фибробластоподобными клетками, максимум митозов наблюдался к 96 часам после посева, модальное число хромосом ($2n = 46$) составляло 83–90 %. Электронная микроскопия подтверждала нормальную ультраструктуру, характерную для диплоидных клеток. Число клеток с гипо-, гипер- и полиплоидным набором, со структурными нарушениями хромосом определялось в соответствии с требованиями ВОЗ. Изучение подвижности изоферментов Г-6-ФДГ (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа) и ЛДГ (лактатдегидрогеназа) показало отсутствие контаминации клетками других видов, посторонними агентами, в том числе и микоплазмами. Туморогенные и онкогенные свойства клеток не были выявлены ни на иммуносупрессированных животных, ни в органных культурах кожи куриного эмбриона. Представленные авторами банки клеточных линий были зарегистрированы в ГИСК им. Л. А. Тарасевича в качестве национальных для приготовления профилактических и диагностических препаратов [46, 47]. Впоследствии эти клеточные культуры были использованы для применения в заместительной терапии в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», ФБУН «ЕНИИВИ»

Роспотребнадзора (г. Екатеринбург), ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (г. Новосибирск).

В Институте им. Н. В. Склифосовского в комбустиологии для лечения пациентов на поверхность раны накладывали повязку, основание которой было выполнено из гидрофобной перфорированной кремнийорганической пленки Карбоксил-П («ВНИИмедполимер», Россия), покрытой слоем человеческого коллагена типа 1 и охарактеризованными клетками линии диплоидных фибробластов человека М-22 на уровне 15–25 пассажа. Предложенный способ позволил сократить срок заживления ожогов II–IIIА степени до 5–7 суток [48].

Известно о применении клеток М-22 в хирургической пародонтологии. В ФГБУ «ЦНИИСиЧЛХ» Минздрава России для лечения воспалительно-деструктивных форм пародонтита использовались препараты фирмы «Geistlich» (Швейцария): Bio-OSS и Bio-Gide. Перед применением гранулы Bio-OSS пропитывали взвесью клеток линии М-22 и помещали в костные дефекты. Через 3 месяца наблюдалось формирование новых костных структур, исчезновение или резкое снижение остеопороза, увеличивалась четкость контуров кости [49].

Препарат Культура клеток диплоидных человека для заместительной терапии был разработан на основе культуры клеток эмбриона человека ЛЭЧ-4(81), полученной и аттестованной в соответствии с требованиями Всемирной ассоциации клеточных культур в 1983 году группой авторов во главе с профессором Н. П. Глинских. Клеточная культура ЛЭЧ-4(81) представляет собой морфологически однородную популяцию фибробластов с ограниченным сроком жизни определенного тканевого происхождения и сохраняющего стабильный диплоидный кариотип ($2n$ не менее 75 %); культура свободна от антигенов гистосовместимости и не содержит грибов, бактерий, микоплазм и вирусов [50]. Препарат был зарегистрирован Минздравом России в качестве оригинального иммунобиологического препарата и внесен в Государственный реестр лекарственных средств, в 2002 г. был разрешен для медицинского применения и промышленного выпуска.

Препарат успешно применяется в комбустиологии и хирургии (лечение глубоких и обширных ожогов любых ран, трофических язв, в том числе при сахарном диабете), в стоматологии (при оперативном лечении пародонтита, периодонтита, цистэктомии, резекции верхушки корня зуба, рецессии десны, вестибулопластике, язвенно-некротических поражениях слизистой оболочки полости рта, после удаления зуба с целью ускорения костной регенерации при последующей имплантации, в имплантологии), в челюстно-лицевой хирургии, в косметологии (для лечения возрастных изменений кожи, угревой болезни, рубцов, алопеций, папиллом, бородавок, шипиг), у больных с травмами опорно-двигательного аппарата. Для применения в комбустиологии препарат выпускается в виде взвеси клеток и на биополимерном покрытии Фолидерм, для стоматологии — на остеопластических материалах Гапкол-Л и Коллапан-Л, содержащих коллаген и гидроксиапатит [51, 52]. На основе препарата Культура клеток диплоидных человека для заместительной терапии была получена лиофилизированная форма аллофибробластов (АФБ) для лечения герпесвирусных инфекций. Препарат АФБ оказался эффективным также при лечении глубоких обширных субдермальных ожоговых ран III(A, Б) и IV степени, при обморожениях, при лечении слизистых оболочек ротовой полости и носоглотки. Было показано, что препа-

рат АФБ обладает бактерицидным репаративным действием [53].

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск) на основе штаммов диплоидных клеток легкого эмбриона человека (Л-68), фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ 16-1) и кожно-мышечной ткани человека (ФЭЧ 16-2) был разработан препарат Культуры клеток диплоидные человека для заместительной терапии. Препарат выпускают в форме монослойной культуры клеток на основе биodeградируемого носителя коллаген-хитозановой пленки, суспензии клеток в питательной среде или растворе Хэнкса, суспензии клеток в питательной среде Игла MEM в замороженном состоянии и суспензии клеток в 5 % геле полиэтиленоксида. Морфологически диплоидные линии Л-68, ФЭЧ 16-1 и ФЭЧ 16-2 в фазе активного роста были представлены фибробластоподобными клетками с четко выраженной поточностью. В доклинических исследованиях было подтверждено отсутствие признаков токсичности, анафилактиченности, местного раздражающего действия, пирогенности у животных (ФСП 42-0196532004). В результате проведенных исследований было показано, что в диплоидных клетках отсутствовали возбудители ВИЧ-инфекции, герпеса, туберкулеза, сифилиса, хламидиоза, токсоплазмоза, цитомегалии, уреоплазмоза, микоплазмоза и гепатита В. При проведении опытов по эффективности и безопасности была определена доза препарата и его переносимость при лечении пациентов: с ожогами общей площадью 10–25 % поверхности тела, из которых глубокие ожоги IIIA–IIIB степени составляли 5–15 %; с трофическими язвами на фоне хронической венозной недостаточности; с хроническими ранами после длительных нагноительных процессов; с хроническими язвами на фоне сахарного диабета. Определили вероятность развития нежелательных побочных эффектов и их зависимость от дозы препарата, обширности раневого процесса, сопутствующих заболеваний и терапии. Оценку переносимости препарата проводили на основании визуальной оценки ран в процессе лечения, данных клинического анализа крови, динамики клеточного состава в цитологических отпечатках ран. В результате проведенных исследований было показано, что препарат является малотоксичным, не обладает раздражающим, алергизирующим, токсическим, онкогенным свойствами и может быть применен для лечения пациентов с длительно незаживающими ранами различного генеза [54, 55].

На сегодняшний день использование упомянутых аттестованных эмбриональных клеточных линий человека возможно лишь в научных целях, в клинической практике — запрещено в соответствии с 180-ФЗ.

Развитие новых биомедицинских технологий целиком зависит от наличия необходимого количества клеточного материала, не вызывающего иммунного отторжения трансплантатов. Клеточные культуры могут быть связаны с дополнительными компонентами, тогда их следует рассматривать как часть готового биологического препарата.

Научные исследования, направленные на разработку новых методов применения культуры фибробластов являются актуальными и перспективными, так как позволяют оптимизировать течение репаративных процессов, повысить регенеративные и адаптивные возможности организма.

Заключение

Одним из перспективных методов лечения в современной медицине является заместительная клеточная терапия,

позволяющая восстанавливать пораженные органы и ткани, стимулировать регенеративные и адаптивные возможности организма человека за счет трансплантации клеток, выращенных *in vitro*. Опыт клинического использования в России в рамках медицинских технологий показывает, что особое место в заместительной терапии ДКЛ занимают фибробластоподобные клетки, полученные из эмбриональных тканей. Это в первую очередь относится к ДКЛ, аттестованным в соответствии с требованиями ВОЗ: ЛЭЧ-4(81), Л-68, М-22, ФЭЧ 16-1 и ФЭЧ 16-2. Аттестация и сохранение ДКЛ в криобанках при температуре жидкого азота способствовало сокращению сроков получения трансплантатов, готовых к использованию в клинике через 3–4 суток, а в случае экстренной необходимости через сутки. Однако на сегодняшний день использование на территории Российской Федерации упомянутых аттестованных эмбриональных клеточных линий человека возможно лишь в научных целях, разработки и применение в клинической практике — запрещены в соответствии с 180-ФЗ. Кроме того, биомедицинские клеточные продукты могут использоваться в широкой медицинской практике только после их государственной регистрации [56].

Литература

1. Medawar PB. Sheets of pure epidermal epithelium from human skin. *Nature* 1941; (148): 783–4.
2. Medawar PB. The cultivation of adult mammalian skin epithelium *in vitro*. *Quart Microsc Sci.* 1948; 89: 187–96.
3. Максимов АА. О культивировании *in vitro* соединительной ткани взрослых млекопитающих. *Русский архив анатомии, гистологии и эмбриологии* 1916; 1(1): 115–82.
4. Румянцев АВ. Большая советская энциклопедия 1975; 22: 391–2.
5. Тимофеевский АД. Длительные культуры тканей и малигнизация клеток. *Вестник Академии медицинских наук СССР* 1964; 11(3): 205–6.
6. Хлопин НГ. Большая медицинская энциклопедия 1986; 26: 556.
7. Хрущов ГК. Большая советская энциклопедия 1978; 28: 407.
8. Sanford KK, Earle WR, Likely GD. The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst.* 1948; 9(3): 229–46.
9. Sanford KK, Merwin RM, Hobbs GL, Young JM. Clonal analysis of variant cell lines transformed to malignant cells in tissue culture. *J Natl Cancer Inst.* 1959; 23: 1035–59.
10. Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 1955; 122(3168): 501–14.
11. Колокольцова ТД, Юрченко НД, Нечаева ЕА, Радаева ИФ, Шалунова НВ, Петручук ЕМ и др. Получение аттестованных фибробластов человека, пригодных для научных и медицинских исследований. *Биотехнология* 2007; (1): 58–64.
12. Бобро ЛИ. Фибробласты и их значение в тканевых реакциях. *Архив патологии* 1990; 52(12): 65–8.
13. Гончарова ВП. Факторы роста фибробластов (краткий обзор). *Физиологический журнал им. И. М. Сеченова* 1994; 9(80): 163–73.
14. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25: 585–621.
15. Coulomb B, Saïag P, Bell E, Breitburd F, Lebreton C, Heslan M, Dubertret L. A new method for studying epidermalization *in vitro*. *Br J Dermatol.* 1986; 114(1): 91–101.
16. Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J Invest Dermatol.* 1989; 92(1): 122–5.
17. Туманов ВП, Жакота ДА, Корчагина НС. 30-летний опыт разработки и применения клеточных технологий в клинической практике. *Пластическая хирургия и косметология* 2012; (3): 433–49.
18. Олефир ЮВ, Медуницын НВ, Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Мовсисянц АА, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Современные биологиче-

- ские / биотехнологические лекарственные препараты. Актуальные вопросы разработки и перспективы использования. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16(2): 67–77.
19. Чаплыгин СС. Применение культуры аллофибробластов в лечении раневых дефектов кожного покрова (экспериментальное исследование): дис. ... канд. мед. наук. Самара; 2013.
 20. Келлер Г, Себастиан Дж, Лакомбе Ю, Тофт К, Ласк Г, Ревазова Е. Сохранность инъецируемых аутологичных человеческих фибробластов. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2000; 130(8): 203–6.
 21. Gerlach JC, Johnen C, Ottomann C, Bräutigam K, Plettig J, Belfekroun C, et al. Method for autologous single skin cell isolation for regenerative cell spray transplantation with non-cultured cells. Int J Artif Organs 2011; 34(3): 271–9.
 22. Савинцева ИВ, Селезнева ИИ, Гаврилюк БК. Гидроген на основе коллагена типа 1 и хитозана — система иммобилизации и направленной доставки клеток. В кн.: Сборник тезисов конференции «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении». М.; 2006; С. 19–20.
 23. Хрупина АС, Юркевич ЮВ, Смолянинов АБ, Трофимова ИЛ, Супильникова ОВ, Крылов КМ и др. Применение геля гидроксизтилцеллюлозы в качестве клеточного носителя для трансплантации культивированных аллофибробластов на обширные раневые поверхности. Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения 2013; 8(2): 698–700.
 24. Адамян АА, Голованова ПМ, Добыш СВ, Килимчук ЛЕ, Кригер АГ, Фрончек ЭВ. Биологическая композиция для лечения ран «Коллахит». Патент Российской Федерации, № 2108114; 1998.
 25. Саркисов ДС, Федоров ВД, Глуценко ЕВ, Алексеев АА, Туманов ВП, Серов ГГ и др. Использование культивированных фибробластов при лечении обожженных. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1995; (6): 566–70.
 26. Алексеев АА, Саркисов ДС, Яшин АЮ, Кашин ЮД, Крутиков МГ. Восстановление кожных покровов на основе применения культивированных аллофибробластов. В кн.: Материалы городской научно-практической конференции «Новые медицинские технологии в лечении тяжелообожженных» М.; 1997; С. 52.
 27. Алексеев АА, Кашин ЮД, Яшин АЮ, Рахеев АМ. Техника хирургического лечения на основе применения культивированных аллофибробластов. В кн.: Материалы II Международного симпозиума «Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи». Саратов: 1998; С. 9–12.
 28. Алейник ДЯ, Аминев ВА, Чарыкова ИН, Кувакина НА. Использование современных биотехнологий для лечения поверхностных ожогов у детей младшего возраста. В кн.: Материалы II Международного симпозиума «Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи». Саратов; 1998; С. 6–8.
 29. Рашитова АД, Фаязов РР, Мухамедьянов ГС, Чистоступов КС. Клеточные технологии в комплексном лечении трофических язв при тяжелой хронической венозной недостаточности. Кубанский научный медицинский вестник 2008; 6(105): 60–3.
 30. Седов ВМ, Андреев ДЮ, Смирнова ТД, Парамонов БА, Енькина ТН, Соминина АА и др. Клеточная терапия в лечении трофических язв нижних конечностей. Вестник хирургии им. И. И. Грекова 2006; 165(2): 90–4.
 31. Винник ЮС, Салмина АБ, Дробушевская АИ, Теплякова ОВ, Пожиленкова ЕА, Зыкова ЛД. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении длительно незаживающих ран. Вестник экспериментальной и клинической хирургии 2011; 4(2): 392–7.
 32. Поматилов АА. Лечение острых и хронических ран в оториноларингологии методом трансплантации культивированных аллофибробластов человека: дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2008.
 33. Туманов ВП, Пальчун ВТ, Поматилов АА, Миронов АА. Способ устранения травматического дефекта барабанной перепонки. Патент Российской Федерации, № 2165765; 2001.
 34. Гундоров РА, Макаров ПВ, Васильев АВ, Терских ВВ, Ходжабекян ГВ, Правильникова ПА и др. Способ лечения эрозии роговицы. Патент Российской Федерации, № 2173122; 2001.
 35. Рунова ГС. Использование культивированных аллофибробластов в комплексном лечении заболеваний пародонта: дис. ... канд. мед. наук. М.; 2000.
 36. Кяримова РР, Лахонина КА, Фаркашди Ш. Применение фибробластов в стоматологии. Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке» 2008; 10(12): 486–7.
 37. Туманов ВП, Рунова ГС, Туманова ЕЛ. Способ восстановления костных структур челюсти. Патент Российской Федерации, № 2336830; 2008.
 38. Крихели ЗА, Згурский АА, Терехов СМ. Применение аутогенных фибробластов в косметологии. Эстетическая медицина 2004; 3(4): 336–42.
 39. Зорин ВЛ, Зорина АИ, Черкасов ВР, Копнин ПБ, Деев РВ, Исаев АА и др. Качественная и количественная оценка состояния кожи лица после применения аутологичных дермальных фибробластов. Вестник эстетической медицины 2011; 10(2): 16–26.
 40. Зорина АИ, Зорин ВЛ, Черкасов ВР. Дермальные фибробласты: разнообразие фенотипов и физиологических функций, роль в старении кожи. Эстетическая медицина 2012; 11(1): 15–31.
 41. Анджапаридзе ОГ, Доссер ЕМ, Рапопорт РИ, Унанов СС, Дорофеев ВМ, Яблокова МЛ и др. Живая коревая вакцина на диплоидных клетках человека (безопасность, реактивность, иммуногенность). Вопросы вирусологии 1967; (6): 651–7.
 42. ХАВРИКС® (HAVRIX) инструкция по применению. VIDAL Справочник лекарственных средств. Available from: https://www.vidal.ru/drugs/havrix_924.
 43. ФС. 3.3.1.0024.15. Вакцина против краснухи культуральная живая. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 3. М. 2015. С. 964–72. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
 44. Колокольцова ТД, Шалунова НВ, Петручук ЕМ. К вопросу о контроле безопасности культур клеток, пригодных для заместительной терапии. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2006; (2): 8–12.
 45. Радаева ИФ, Нечаева ЕА, Дроздов ИГ. Коллекция культур клеток ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Новосибирск: ЦЭРИС; 2009. С. 251.
 46. Шалунова НВ, Меркулов ВА, Комратов АВ, Петручук ЕМ, Семенова ИС, Волгин АР, Трусов ГА. Требования к клеточным культурам, используемым для производства и контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. Вedomosti Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013; (1): 28–32.
 47. Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Рачинская ОА, Чаплыгина АА, Меркулов ВА, Олефир ЮВ и др. Современные подходы к проведению оценки качества препаратов для клеточной терапии. Биофармацевтический журнал 2016; 8(4): 35–46.
 48. Хватов ВБ, Конюшко ОИ, Ермолов АС, Смирнов СВ, Жиркова ЕА, Бочарова ВС, Миронова ЛЛ. Способ лечения ожоговой раны. Патент Российской Федерации, № 2373944; 2009.
 49. Грудянов АИ, Ерохин АИ, Бякова СФ. Применение препаратов фирмы «Geistlich» (Bio-Oss, Bio-Gide). Новое в стоматологии 2001; (8): 72–7.
 50. Глинских НП, Устьянцев ИВ, Бахарева АА, Устьянцев ПВ, Бахарева ТЛ. Способ получения препаратов для медицинских целей. Патент Российской Федерации, № 2398873; 2010.
 51. Штукатуров АН, Марковская ОВ, Салистый ПВ. Организация помощи детям с термической травмой в Свердловской области. В кн.: Материалы тезисов III съезда комбустиологов России. М.; 2010; С. 49–51.
 52. Глинских НП, Новикова ИА, Ронь ГИ, Устьянцев ИВ. Композиция для лечения воспалительных заболеваний пародонта на

основе клеточных культур. Патент Российской Федерации, № 2210352; 2003.

53. Глинских НП, Донник ИМ, Порываева АП, Шилова ЕН, Устьянцев ИВ. Использование лиофилизированного препарата аллофибробластов для лечения заболеваний, вызванных вирусом герпеса. *Аграрный вестник Урала* 2012; 7(99): 25–7.
54. ОФС. 1.7.2.0011.15. Требования к клеточным культурам — субстратам производства иммунобиологических лекарств-

венных препаратов. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 2. М. 2015. С. 672–88. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.

55. Колокольцова ТД, Нечаева ЕА, Юрченко НД. Штамм диплоидных клеток человека для заместительной терапии (варианты). Патент Российской Федерации, № 2285040; 2006.
56. Федеральный закон от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

Об авторах

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

Петручук Елена Мидатовна. Эксперт 1-й категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИПБ. Шалунова Нина Васильевна. Главный эксперт Управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, проф.

Олефир Юрий Витальевич. Генеральный директор, д-р мед. наук.

Борисевич Игорь Владимирович. Директор Центра планирования и координации НИР, д-р мед. наук, проф.

Перекрест Валентина Васильевна. Ведущий эксперт управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

Шевцов Владимир Александрович. Начальник управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. мед. наук.

Рукавишников Андрей Владимирович. Заместитель начальника управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

Хантимирова Лейсан Маратовна. Аналитик управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП.

Адрес для переписки: Петручук Елена Мидатовна; Petruchuk@expmed.ru

Cell cultures in replacement therapy

E. M. Petruchuk, N. V. Shalunova, Yu. V. Olefir, I. V. Borisevich, V. V. Perekrest, V. A. Shevtsov, A. V. Rukavishnikov, L. M. Khantimirova

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Cell replacement therapy is one of the top priority areas of modern medicine, which is aimed at restoring the structure and functions of damaged tissues by transplanting cells grown *in vitro*. The article summarizes data obtained in several studies of diploid cell lines (allogeneic fibroblasts) used as replacement therapy in various therapeutic areas as part of application of medical technology innovations. The article describes benefits of using fibroblasts and the routes of cell culture administration. At present the use of medicinal products containing viable human cells (biomedical cell products) is regulated by Federal Law 180-FZ «On biomedical cell products» of 23 June 2016. Cell cultures used in the production of biomedical cell products should be morphologically homogeneous populations of cells derived from a specific tissue and should have a limited life span, a stable karyotype (at least 75 % of cells should have a double set of chromosomes), should not be associated with cancer risks, be free from extraneous agents, have low levels of histocompatibility antigens expression. According to 180-FZ, all characteristics of a cell line supporting the quality of a biomedical cell product should be reflected in the biomedical cell product specification. Before the adoption of 180-FZ only certified cell cultures could be clinically used. The therapeutic potential of fibroblasts related to optimization of reparative processes, improvement of regenerative and adaptive capabilities, as well as the accumulated experience of their clinical use are stirring interest to the development of fibroblast-based biomedical cell products and their use as replacement therapy. However, it should be pointed out that according to 180-FZ biomedical cell products may not be produced using «biological material obtained by interrupting or jeopardising an embryo/fetus development process».

Key words: cell cultures; diploid cells; autologous fibroblasts; allogeneic fibroblasts; cell transplantation; tissue transplantation; biomedical cell products.

Bibliographic description: Petruchuk EM, Shalunova NV, Olefir YuV, Borisevich IV, Perekrest VV, Shevtsov VA, Rukavishnikov AV, Khantimirova LM. Cell cultures in replacement therapy. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(4): 197–206.

References

1. Medawar PB. Sheets of pure epidermal epithelium from human skin. *Nature* 1941; (148): 783–4.
2. Medawar PB. The cultivation of adult mammalian skin epithelium *in vitro*. *Quart Microsc Sci.* 1948; 89: 187–96.
3. Maksimov AA. *In vitro* culture of adult mammals conjunctive tissue. *Russkij arhiv anatomii, gistologii i embriologii* 1916; 1(1): 115–82 (in Russian).
4. Rumjantsev AV. *The Great Soviet Encyclopedia* 1975; 22: 391–392 (in Russian).
5. Timofeevskij AD. Long-term tissue cultures and malignancy of cells. *Vestnik Akademii medicinskih nauk SSSR* 1964; 11(3): 205–6 (in Russian).
6. Khlopin NG. *The Great Soviet Encyclopedia* 1986; 26: 556 (in Russian).
7. Hrushhov GK. *The Great Soviet Encyclopedia* 1978; 28: 407 (in Russian).

8. Sanford KK, Earle WR, Likely GD. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst.* 1948; 9(3): 229–46.
9. Sanford KK, Merwin RM, Hobbs GL, Young JM. Clonal analysis of variant cell lines transformed to malignant cells in tissue culture. *J Natl Cancer Inst.* 1959; 23: 1035–59.
10. Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 1955; 122(3168): 501–14.
11. Kolokol'tsova TD, Yurchenko ND, Nechaeva EA, Radaeva IF, Shalunova NV, Petruchuk EM, et al. Obtaining of certified human fibroblasts that are suitable for scientific and medical studies. *Biotechnology in Russia* 2007; (1): 58–64 (in Russian).
12. Bobro LI. Fibroblasts and their significance in tissue reactions. *Arkiv Patologii* 1990; 52(12): 65–8 (in Russian).
13. Goncharova VP. Fibroblast growth factors (a short review). *Fiziologicheskii Zhurnal Imeni I. M. Sechenova* 1994; 9(80): 163–73 (in Russian).
14. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25: 585–621.
15. Coulomb B, Saiag P, Bell E, Breitburd F, Lebreton C, Heslan M, Dubertret L. A new method for studying epidermalization in vitro. *Br J Dermatol.* 1986; 114(1): 91–101.
16. Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J Invest Dermatol.* 1989; 92(1): 122–5.
17. Tumanov VP, Zhakota DA, Korchagina NS. 30 year experience of development and application of cell technologies in clinical practice. *Plasticheskaja hirurgija i kosmetologija* 2012; (3): 433–49 (in Russian).
18. Olefir YuV, Medunitsyn NV, Avdeeva Zhl, Soldatov AA, Movsesyants AA, Merkulov VA, Bondarev VP. Modern biological/biotechnological medicinal products. Topical issues and prospects for development. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(2): 67–77 (in Russian).
19. Chaplygin SS. Application of allofibroblasts in the treatment of wound defects in the skin (experimental study). *Cand. Med. Sci. [dissertation]. Samara;* 2013 (in Russian).
20. Keller G, Sebastian J, Lacombe U, Toft K, Lask G, Revazova E. Safety of injectable autologous human fibroblasts. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2000; 130(8): 786–9 (in Russian).
21. Gerlach JC, Johnen C, Ottomann C, Bräutigam K, Plettig J, Belfekroun C, et al. Method for autologous single skin cell isolation for regenerative cell spray transplantation with non-cultured cells. *Int J Artif Organs* 2011; 34(3): 271–9.
22. Savinceva IV, Selezneva II, Gavriluk BK. Collagen type 1 based and chitosan hydrogen is a system of immobilization and directional cell delivery. In: *Stem Cells and Perspectives of Their Use in Health Care: Proc. Conference. Moscow, 2006. P. 19–20* (in Russian).
23. Hrupina AS, Yurkevich YuV, Smolyaninov AB, Trofimova IL, Supilnikova OV, Krylov KV, et al. The use of hydroxyethyl cellulose gel as a carrier for transplantation of cultured allogenic fibroblasts on extensive wound surfaces. *Zdorov'e — osnova chelovecheskogo potentsiala: problemy i puti ih reshenija* 2013; 8(2): 698–700 (in Russian).
24. Adamjan AA, Golovanova PM, Dobysh SV, Kilimchuk LE, Kriger AG, Fronchek EV. Biological composition for the treatment of wounds «Kollahit». *Patent RF, № 2108114;* 1998 (in Russian).
25. Sarkisov DS, Fedorov VD, Glushchenko EV, Alekseev AA, Tumanov VP, Serov GG et al. Use of cultured fibroblasts for restoration of skin in severe burns. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 1995; (6): 566–70 (in Russian).
26. Alekseev AA, Sarkisov DS, Jashin AJu, Kashin JuD, Krutikov MG. Skin regeneration of by using cultured allofibroblasts. In: *New medical technologies in the treatment of heavy-burned: Proc. Scientific and practical conference. Moscow, 1997. P. 52* (in Russian).
27. Alekseev AA, Kashin YuD, Jashin AYU, Rahaev AM. The technique of surgical treatment based on the application of cultured allofibroblasts. In: *New methods of treating burns using cultured skin cells: Proc. 11th Int. Symp. Saratov, 1998. P. 9–12* (in Russian).
28. Alejnik DJa, Aminev VA, Charykova IN, Kuvakina NA. The use of modern biotechnologies for the treatment of superficial burns in young children. In: *New methods of treating burns using cultured skin cells: Proc. 11th Int. Symp. Saratov, 1998. P. 6–8* (in Russian).
29. Rashitova AD, Fayazov RR, Muhamedyanov GS, Chistostupov KS. Stem cell technology in the complex treatment of trophic ulcers in severe chronic venous insufficiency. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik* 2008; (6): 60–3 (in Russian).
30. Sedov VM, Andreev DYU, Smirnova TD, Paramonov BA, Enkina TN, Sominina AA, et al. Cell therapy in treatment of trophic ulcers of lower extremities. *Vestn Khir Im I I Grek.* 2006; 165(2): 90–4 (in Russian).
31. Vinnik YuS, Salmina AB, Drobushvskaya AI, Teplyakova OV, Pogilenkova EA, Zicova LD. The cell technologies and the tissue engineering are for healing chronic wounds. *Vestnik Eksperimental'noj i Klinicheskoy Hirurgii* 2011; 4(2): 392–7 (in Russian).
32. Pomatilov AA. Treatment of acute and chronic wounds in otorhinolaryngology by the method of transplantation of cultured human allofibroblasts. *Dr. Med. Sci. [dissertation]. Moscow;* 2008 (in Russian).
33. Tumanov VP, Pal'chun VT, Pomatilov AA, Mironov AA. Method for eliminating a traumatic defect of the tympanic membrane. *Patent RF, № 2165765;* 2001 (in Russian).
34. Gundorova RA, Makarov PV, Vasilyev AV, Terskih VV, Hodzhabekeyan GV, Pravilnikova PA, et al. Method for treating corneal erosion. *Patent RF, № 2173122;* 2001 (in Russian).
35. Runova GS. The use of cultured allofibroblasts in the complex treatment of periodontal diseases. *Dr. Med. Sci. [dissertation]. Moscow;* 2000 (in Russian).
36. Kjarimova RR, Lahonina KA, Farkashdi Sh. The use of fibroblasts in dentistry. *Elektronnyj nauchno-obrazovatel'nyj vestnik «Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke»* 2008; 10(12): 486–7 (in Russian).
37. Tumanov VP, Runova GS, Tumanova EL. Method of regeneration of the jaw bone structures. *Patent RF, № 2336830;* 2008 (in Russian).
38. Kriheli EA, Zgurskij AA, Terehov SM. Application of autologous fibroblasts in cosmetology. *Esteticheskaja medicina* 2004; 3(4): 336–42 (in Russian).
39. Zorin VL, Zorina AI, Cherkasov VR, Kopnin PB, Deev RV, Isaev AA, et al. Face skin condition quality and quantity estimation after autologous dermal fiberblasts application. *Vestnik Esteticheskoy mediciny* 2011; 10(2): 16–26 (in Russian).
40. Zorina AI, Zorin VL, Cherkasov VR. Dermal fibroblasts: a variety of phenotypes and physiological functions, a role in skin aging. *Esteticheskaja medicina* 2012; 11(1): 15–31 (in Russian).
41. Andzhaparidze OG, Dosser EM, Rapoport RI, Unanov SS, Dorofeev VM, Iablokova ML et al. Live measles vaccine from human diploid cells (safety, reactogenicity and immunogenicity). *Vopr Virusol.* 1967; (6): 651–7 (in Russian).
42. HAVRIX® Instruction for medical use. *VIDAL Medicines Compendium.* Available from: https://www.vidal.ru/drugs/havrix_924 (in Russian).
43. FS. 3.3.1.0024.15. Rubella vaccine live cultural attenuated. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 3. P. 964–72.* Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
44. Kolokol'tsova TD, Shalunova NV, Petruchuk EM. To the question of controlling the safety of cell cultures suitable for substitution therapy. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2006; (2): 8–12 (in Russian).
45. Radaeva IF, Nechaeva EA, Drozdov IG. Collection of cell cultures FGUN GNC VB «Vector» *Rospotrebnadzor. Novosibirsk: TCERIS;* 2009. P. 251 (in Russian).
46. Shalunova NV, Merkulov VA, Comratov AV, Petruchuk EM, Semenova IS, Volgin AR, Trusov GA. Requirements for cell cultures, used for manufacture and quality control of immunobiological medicines. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2013; (1): 28–32 (in Russian).
47. Melnikova EV, Merkulova OV, Rachinskaya OA, Chaplenko AA, Merkulov VA, Olefir YuV, et al. Modern approaches to quality control of cell-therapy products. *Biopharmaceutical J.* 2016; 8(4): 35–46 (in Russian).
48. Hvato VB, Konyushko OI, Ermolov AS, Smirnov SV, Zhirkova EA, Bocharova VS, Mironova LL. Treatment of burn wound. *Patent RF, № 2373944;* 2009 (in Russian).
49. Grudjanov AI, Erohin AI, Bjakova SF. Application of preparations of firm «Geistlich» (Bio-Oss, Bio-Gide). *Novoe v stomatologii* 2001; (8): 72–7 (in Russian).
50. Glinskikh NP, Ustyancev IV, Baharev AA, Ustyancev PV, Bahareva TL. Method of obtaining drugs for medical purposes. *Patent RF, № 2398873;* 2010 (in Russian).
51. Shtukaturov AK, Markovskaja OV, Salistij PV. Organization of assistance to children with thermal trauma in the Sverdlovsk region

- In: Proc. IIIth congress of Russia combustiologists. Moscow, 2010. P. 49–51 (in Russian).
52. Glinskikh NP, Novikova IA, Ron' GI, Ustyancev IV. Cell cultures based composition for the treatment of inflammatory periodontal diseases. Patent RF, № 2210352; 2003 (in Russian).
 53. Glinskikh NP, Donnik IM, Poryvayeva AP, Shilova EN, Ustyantsev IV. The use of lyophilized preparation alofibroblasts for treatment of diseases caused by the herpes virus. Agrarnyj vestnik Urala 2012; 7(99): 25–7 (in Russian).
 54. OFS. 1.7.2.0011.15. Requirements for cell cultures — substrates for the production of immunobiological drugs. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 2. P. 672–88. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
 55. Kolokol'tsova TD, Nechaeva EA, Jurchenko ND. Strain of human diploid cells for replacement therapy (variants). Patent RF, № 2285040; 2006 (in Russian).
 56. The Federal Law of June 23, 2016 № 180-FZ «On Biomedical Cell Products» (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Petruchuk EM. 1st professional category expert of the Laboratory of viral vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Shalunova NV. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Olefir YuV. Director-General. Doctor of Medical Sciences.

Borisevich IV. Director of the Centre for Planning and Coordination of Scientific Activities. Doctor of Medical Sciences, professor.

Perekrest VV. Leading expert of the Division for Expert Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Candidate of Biological Sciences.

Shevtsov VA. Head of the Division for Expert Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Candidate of Medical Sciences.

Rukavishnikov AV. Deputy head of the Division for Expert Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Candidate of Biological Sciences.

Khantimirova LM. Analyst of the Division for Expert Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products.

Contact e-mail: Petruchuk Elena Midatovna; Petruchuk@expmed.ru

Сравнительный анализ использования цельноклеточных и бесклеточных коклюшных вакцин для профилактики коклюшной инфекции

И. А. Алексеева, О. В. Перелыгина

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

Поступила 15.06.2017 г. Принята к публикации 26.10.2017 г.

В связи с ростом во многих странах мира заболеваемости коклюшем остро встал вопрос о вакцинах, используемых для иммунопрофилактики коклюша. Работа посвящена анализу применения цельноклеточной и бесклеточной коклюшных вакцин (ЦКВ и БКВ соответственно). Представленные материалы демонстрируют, что выбор коклюшной вакцины (ЦКВ или БКВ) играет определяющую роль в формировании иммунной прослойки населения. Широкое использование в 1950–1960 гг. ЦКВ привело к более чем 90 % снижению заболеваемости коклюшем и смертности от него. При высокой эффективности ЦКВ обладают определенной реактогенностью (особенно выраженной у зарубежных вакцин, содержащих в своем составе, по сравнению с отечественными препаратами, в 1,5–2 раза больше убитых коклюшных клеток). Альтернативным препаратом является БКВ, обладающая, по сравнению с ЦКВ, значительно меньшей реактогенностью. Имеющиеся данные указывают, что лицензированные БКВ и ЦКВ имеют эквивалентные показатели первичной эффективности в предотвращении заболевания в течение первого года жизни, но наблюдается более быстрое ослабление иммунитета и снижение влияния на передачу патогенного агента при применении БКВ в отличие от ЦКВ. Защита после введения бустерных доз БКВ ослабевает быстрее среди индивидуумов, которым во время первичной серии вводилась БКВ, а не ЦКВ. Эксперты полагают, что после введения повторной бустерной дозы БКВ ослабление иммунитета произойдет быстрее. Данные эпиднадзора позволили экспертам сделать вывод, что использование БКВ может привести к возрождению коклюша, и подобное возрождение может увеличить риск возникновения смертельного исхода среди детей, слишком маленьких для вакцинации. Подтверждением данного положения является рост заболеваемости коклюшем в развитых странах, где вакцинопрофилактика предполагает использование только БКВ. Необходимо привлечь внимание специалистов к выбору профилактического препарата с учетом его влияния на длительность и напряженность формируемого иммунитета.

Ключевые слова: цельноклеточная коклюшная вакцина; бесклеточная коклюшная вакцина; эффективность и безопасность коклюшных вакцин.

Библиографическое описание: Алексеева ИА, Перелыгина ОВ. Сравнительный анализ использования цельноклеточных и бесклеточных коклюшных вакцин для профилактики коклюшной инфекции. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(4): 207–215.

Коклюш относится к инфекционным заболеваниям, представляющим значение для международного здравоохранения. Это обусловлено высокой контагиозностью бактерий *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), значительной, даже в настоящее время, летальностью в возрастной группе до 1 года, отсутствием длительного постинфекционного иммунитета, сравнительно непродолжительным поствакцинальным иммунитетом.

ВОЗ, в соответствии со своими полномочиями предоставлять государствам-членам ВОЗ рекомендации по вопросам политики в области здравоохранения, регулярно выпускает обновляемые документы по позиции организации в отношении вакцин против болезней, в том числе коклюша, имеющих важное значение. Опубликованные материалы ВОЗ представляют собой выверенную информацию, основанную на анализе огромного объема сведений, поступающих из разных стран мира. Подготовленные документы рассматриваются сотрудниками ВОЗ и внешними экспертами, затем рассматриваются и утверждаются Стратегической консультативной группой экспертов (The Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on immunization) ВОЗ по иммунизации (<http://www.who.int/immunization/>

[sage/en/](http://www.who.int/immunization/)), после чего публикуются. Последний документ ВОЗ «Вакцины против коклюша: документ по позиции ВОЗ — август 2015 г.» [1] содержит самые актуальные данные, касающиеся коклюша и его профилактики путем вакцинации; он заменяет документ по позиции, опубликованный в 2010 году [2] и включает пересмотренные рекомендации в отношении выбора вакцин против коклюша, опубликованные в июле 2014 г. [3].

Целью работы является сравнительный анализ использования цельноклеточных и бесклеточных коклюшных вакцин для профилактики коклюшной инфекции, основанный на изучении публикаций современной научной литературы.

Коклюш остается серьезной причиной смертности и заболеваемости среди детей младенческого возраста во всем мире, несмотря на высокий уровень охвата прививками [4].

Коклюш вызывается грамотрицательными коккобактериями *B. pertussis*, которые инфицируют клетки мерцательного эпителия дыхательных путей человека. Клетки *B. pertussis* имеют ряд факторов патогенности, которые включают коклюшный токсин (КТ), филаментозный ге-

магглютинин (ФГА), пертактин (ПРН), фимбрии (ФИМ) типов 2 и 3, аденилатциклазный токсин (АЦТ), трахеальный цитотоксин (ТЦТ) и липополисахарид (ЛПС). В настоящее время патогенез коклюша в общих чертах можно представить следующим образом: ФГА, ПРН и ФИМ способствуют прикреплению бактерий к эпителиальным клеткам, а КТ, ТЦТ и АЦТ участвуют в разрушении эпителиальных клеток и противостоят воздействию иммунной системы хозяина.

Заболевание является эндемичным, эпидемические циклы наблюдаются каждые 2–5 лет (обычно 3–4 года), даже после внедрения эффективных программ иммунизации и достижения высокого охвата прививками. Большинство клинически выраженных случаев коклюша отмечается среди детей в возрасте 1–5 лет. Случаи смерти, как правило, регистрируются почти всегда в течение первых недель и месяцев жизни больного ребенка [5]. В развивающихся странах показатель летальности составляет почти 4 % среди детей младенческого возраста и 1 % — среди детей в возрасте 1–4 года [6]. В Сенегале, например, показатель летальности среди детей в возрасте младше 5 лет составлял 2,8 % [7]. Среди детей более старшего возраста, подростков и взрослых коклюш часто не диагностируется из-за обычно нетипично протекающего заболевания.

Различают три стадии заболевания: катаральную, пароксизмальную, характеризующуюся приступами спастического кашля, и выздоровление.

Этиологическая диагностика основана на выделении *B. pertussis* из проб, взятых из носоглотки в течение катарального и начала пароксизмального периодов. Традиционно выделенная бактериальная культура рассматривается ВОЗ в качестве золотого стандарта для лабораторного подтверждения коклюша [8]. Но возможность выделения бактериальной культуры ограничена началом лекарственной терапии. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) более чувствительна и может проводиться с теми же биологическими пробами, что и для бактериологических исследований, хотя в зависимости от специфичности используемого праймера может произойти перекрестная реакция с другими видами рода *Bordetella* [9]. Эксперты ВОЗ не рекомендуют проводить реакцию прямой иммунофлюоресценции на материале, полученном из носоглотки, так как ее результаты часто могут быть ложноположительными или ложноотрицательными [11].

Серологическая диагностика может быть полезной и обычно она основывается на использовании парных проб сыворотки крови, которые должны быть взяты во время ранней катаральной стадии (сыворотка крови, полученная во время острой стадии) и через 1 месяц (сыворотка крови, полученная в период выздоровления). Значительное повышение концентрации специфических антител против КТ в сыворотке крови реконвалесцента подтверждает диагноз коклюша.

После перенесенного коклюша антитела к РТ — единственному антигену, специфичному для *B. pertussis*, — обнаруживаются у 80–85 % пациентов. Но, как отмечают эксперты ВОЗ, ни тип, ни концентрация антител не коррелируют с клинической защитой, роль клеточного иммунитета до конца не идентифицирована. Естественная инфекция не вызывает длительной защиты от коклюша [10]. Повторное инфицирование с клиническими проявлениями может наблюдаться среди подростков и взрослых, такие случаи также регистрируются и среди детей. Продолжительность защиты, связанной с естественным иммунитетом или индуцированной вакцинацией, сложно определить. В связи с этим трудно различить между собой продолжительность иммунитета, вызванного первичной естественной инфек-

цией, и индуцированного симптоматическим или бессимптомным реинфицированием.

Исследователи отмечают возможность плацентарного перехода противокклюшных антител, но, тем не менее, большинство младенцев первых месяцев жизни не защищено от заболевания. Как считают эксперты, это связано с низким и неадекватным уровнем антител, переданных от матери. Проведенные исследования по вакцинации коклюшной вакциной беременных женщин продемонстрировали ее эффективность в обеспечении защиты новорожденных младенцев, что дает основание говорить о наличии защиты за счет образовавшихся антител [11].

Ранее для защиты от коклюшной инфекции использовали АКДС с цельноклеточным или бесклеточным компонентом (DTP или DTap). В настоящее время для иммунопрофилактики коклюша, помимо АКДС, могут быть использованы многокомпонентные препараты, которые, кроме дифтерийного, коклюшного и столбнячного, включают и ряд других компонентов (полиомиелитный, гепатитный, гемофильный). Моновалентные коклюшные вакцины в практике используют редко.

Цельноклеточные коклюшные вакцины (ЦКВ) включают в свой состав убитые бактериальные клетки *B. pertussis*. Разные ЦКВ могут иметь различный антигенный состав. Это обусловлено использованием производителями разных штаммов, способов обезвреживания живой культуры, методов производства и контроля.

ВОЗ разработала ряд рекомендаций, касающихся качества (производства и выпуска серий), безопасности и активности ЦКВ [12]. Эти вакцины обычно не используют среди детей более старшего возраста в связи с их реактогенностью.

В 1950–1960 гг. цельноклеточные вакцины были широко внедрены в индустриально развитых странах, что привело к более чем 90 % снижению заболеваемости коклюшем и смертности от него. ЦКВ с 1974 г. включены в Расширенную программу иммунизации. Иммунный ответ на ЦКВ направлен против массива бактериальных антигенов. Как отмечают эксперты ВОЗ, при применении ЦКВ разных производителей отмечается значительное различие в иммунном ответе на коклюшные антигены. Данные по иммуногенности сложно интерпретировать и сравнивать в отношении ЦКВ от разных производителей, а данные клинических исследований показывали, что высокоэффективные ЦКВ не обязательно индуцируют наиболее высокие титры антител. Не определена иммунологическая корреляция защиты от заболевания коклюшем, хотя считается, что наличие антител к коклюшному токсину (РТ) может играть роль в обеспечении защиты от тяжелого заболевания среди младенцев.

Защитная активность ЦКВ, как показывает практика, может колебаться в довольно широких пределах. Это связано непосредственно с возможностью производителя изготовить высококачественный препарат. Системный обзор [13] эффективности вакцины против коклюша включал 49 рандомизированных контролируемых исследований и 3 когортных исследования; при этом использовали определение ВОЗ клинического случая коклюша [14]. Иммунологическая или клиническая эффективность (efficacy) ЦКВ среди детей составила 78 %, этот показатель значительно варьировал среди вакцин и составлял от 46 % (RR¹ 0,54 (0,46–0,63); 95 %) до 92 % (RR 0,08 (0,05–0,13); 95 %).

¹ RR (Relative Risk — относительный риск) — соответствует показателю «индекс эффективности» (ИЭ), используемому в Российской Федерации.

Рандомизированное исследование двойным слепым методом, проведенное в Сенегале, показало, что 3 дозы ЦКВ продемонстрировали общую эффективность в 55 % против менее тяжелых форм коклюша (определяется как заболевание в течение ≥ 21 дня с кашлем, подтвержденное бактериологически и серологически, или наличием контакта с бактериально подтвержденным случаем), в отличие от 96 % при использовании более специфичного определения случая ВОЗ (≥ 21 дня пароксизмального кашля, помимо тех же подтверждающих критериев) [15].

Эксперты ВОЗ отмечают сравнительную непродолжительность поствакцинального иммунитета. Так, исследование уровня пораженности коклюшем среди местного населения в Соединенном Королевстве в рамках медицины общей практики показало, что эффективность ЦКВ упала со 100 % в первый год после проведения первичной серии вакцинации до 84 % в 4-й год, 52 % в 5-й и 46 % в 6-й год после прививок [16]. По данным [17], продолжительность иммунитета, приобретенного в результате получения трех прививок первичной серии ЦКВ, варьирует от 4 до 12 лет. В отношении используемых в настоящее время вакцин выполненных в 2014 г. системный обзор показал, что после проведения первичной серии вакцинации ежегодная потеря защиты составляет максимум 13 % и минимум 2 % [4, 18].

Побочные поствакцинальные реакции при введении цельноклеточных вакцин явились причиной разработки менее реактогенных бесклеточных вакцин. Первая бесклеточная коклюшная вакцина (БКВ) была разработана в Японии в 1981 г., после чего БКВ стали доминирующим типом, используемым в индустриально развитых странах. Эти вакцины могут содержать один, два, три или пять очищенных антигенов: 1 — только КА (коклюшный анатоксин), 2 — КА и ФГА, 3 — КА, ФГА и ПРН, 5 — КА, ФГА, ПРН и ФИМ типов 2 и 3. Состав зарубежных БКВ, зарегистрированных в Российской Федерации, представлен в таблице 1. Как следует из данных, представленных в таблице 1,

дифтерийный, столбнячный и гепатитные компоненты в отечественных АКДС и Бубо-Кок вакцинах содержатся в значительно меньшем количестве, чем в зарубежных препаратах: 15 Lf вместо 25–30 Lf (дифтерийного анатоксина); 5 ЕС (Lf) вместо 10 Lf (столбнячного анатоксина) и 5 мкг HBsAg вместо 10 мкг. При этом меньшее количественное содержание антигенов обеспечивает требуемую специфическую (защитную) активность, что говорит о высоком качестве отечественных препаратов.

Эксперты ВОЗ отмечают, что четкое влияние конкретных бесклеточных антигенов на защиту не ясно. Вакцины отличаются не только по числу антигенных компонентов и их количественному содержанию, но также и по типу бактериального клона, использованного в производстве вакцины, методам очистки и детоксикации (глутаральдегид, формальдегид, перекись водорода или генетический метод), адъювантам и используемым консервантам, таким как тиомерсал и феноксиэтанол [19]. В связи с вышеперечисленным проведение сравнительного анализа БКВ, произведенных разными предприятиями, представляет трудности. ВОЗ разработала ряд рекомендаций в отношении качества (для производства и выпуска серии), безопасности и активности БКВ [19]. Разработаны вакцины для ревакцинации, содержащие уменьшенные дозы столбнячного и дифтерийного анатоксинов.

По результатам рандомизированного контролируемого исследования, при котором проводили сравнение 3-компонентной и 5-компонентной бесклеточных вакцин, было сделано заключение, что эффективность ЦКВ и БКВ была сходной в отношении бактериологически подтвержденного коклюша с минимум 21-дневным пароксизмальным кашлем: RR для 5-компонентной вакцины по сравнению с реципиентами ЦКВ был 0,85 (0,41–1,79), и RR для 3-компонентной вакцины был 1,38 (0,71–2,69). В отношении бактериологически подтвержденных случаев коклюша RR для 5-компонентной вакцины по сравнению с реципиентами ЦКВ был 1,4 (0,78–2,52), а для 3-компонент-

Таблица 1. Состав одной дозы (0,5 мл) комбинированных вакцин, содержащих бесклеточный или цельноклеточный коклюшный компонент

Компонент		Инфанрикс, Бельгия	Инфанрикс-гекса, Бельгия	Пентаксим, Франция	Тетраксим, Франция	АКДС, Россия	Бубо-Кок, Россия
Активные вещества							
Дифтерийный анатоксин	Содержание, Lf	25	25	30	30	15	15
	Активность, МЕ	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30	≥ 30
Столбнячный анатоксин	Содержание, Lf	10	10	10	10	5 ЕС	5
	Активность, МЕ	≥ 40	≥ 40	≥ 40	≥ 40	≥ 60	≥ 60
Коклюшный компонент, млрд инактивированных клеток		25	25	25	25	10	10
Коклюшный анатоксин, мкг							
Филаментозный гемагглютинин, мкг		25	25	25	25	—	—
Фимбрии 2/3, мкг							
Пертактин, мкг		8	8	—	—	—	—
HBsAg, мкг		—	10	—	—	—	5
Вирус полиомиелита тип 1, ЕД D-антигена		—	40	—	—	—	—
Вирус полиомиелита тип 2, ЕД D-антигена		—	8	—	—	—	—
Вирус полиомиелита тип 3, ЕД D-антигена		—	32	—	—	—	—
Капсульный полисахарид <i>H. influenzae</i> тип b, конъюгированный со столбнячным анатоксином		—	10 мкг ≈ 25 мкг	10 мкг —	— —	— —	— —

Примечание. Знак «—» означает отсутствие компонента в данной вакцине.

ной вакцины RR был 2,55 (1,5–4,33) [20]. При проведении исследования в Италии иммунологическая эффективность в 84 % (76–89 %) и 84 % (76–90 %) в отношении типичного коклюша была зарегистрирована относительно двух разных 3-компонентных БКВ, по сравнению с малоэффективной ЦКВ [21]. При проведении большого исследования в отношении домашних контактов с первичными случаями в Германии иммунологическая эффективность вакцины составила 88,7 % (76,6–94,6 %) после первичной вакцинации 3-компонентной БКВ (DTaP) [22]. При проведении рандомизированного исследования двойным слепым методом в Сенегале [15] 2-компонентная DTaP-вакцина сравнивалась с DTP-вакциной. Расчеты абсолютной эффективности, полученные при проведении этого исследования (случай–контроль), показали, что БКВ обеспечивает меньшую защиту по сравнению с ЦКВ: 74 % (51–86 %) по сравнению с 92 % (81–97 %) при использовании определения случая ВОЗ, хотя различие не было статистически значимым.

Исследования, проведенные на сегодняшний день, показывают, что БКВ более эффективны, чем малоэффективные ЦКВ (ЦКВ, показавшие субоптимальную эффективность, более не используются), но они могут быть менее эффективны, чем высокоэффективные ЦКВ [1, 23].

Системный обзор трех больших двойных слепых рандомизированных контролируемых исследований в отношении БКВ [24] позволил сделать заключение, что мультикомпонентные БКВ имеют более высокую защитную активность в отношении типичного коклюша и коклюша легкого течения, чем 1- и 2-компонентные БКВ. Системный обзор 49 рандомизированных контролируемых исследований и 3 когортных исследований подтвердил заключение, что 1- и 2-компонентные БКВ имеют более низкую иммунологическую (клиническую) эффективность по сравнению с вакцинами, содержащими ≥ 3 компонентов (67–70 % действенность по сравнению с 80–84 %) [13]. Однако исследования, проведенные после длительного широкомасштабного применения лицензированных 2-компонентных БКВ (первоначально в Швеции [25] и Японии [26]) и 1-компонентной БКВ (используемой в рамках национальной программы иммунизации в Дании), продемонстрировали, что все эти БКВ обладают высокой эффективностью в предотвращении коклюша, независимо от содержания конкретного антигена. Эксперты ВОЗ полагают, что требуются более продолжительные наблюдения и призывают с осторожностью интерпретировать факты более высокой действенности мультикомпонентных вакцин по сравнению с 1- и 2-компонентными вакцинами.

Большое исследование, проведенное в Италии в отношении двух БКВ через 6 лет после завершения первичной серии иммунизации детей (вакцинация проводилась в соответствии с календарем в 2, 4 и 6 месяцев), показало защитную активность в 76 и 85 % соответственно при исследовании двух клинических определений коклюша различной специфичности [27]. В Швеции 2-дозовая первичная серия вакцинации с бустерной дозой в возрасте 12 месяцев обеспечила защиту от коклюша примерно на 5 лет [25].

Эксперты ВОЗ отмечают, что в настоящее время появляется все больше данных о том, что защита после введения бустерных доз БКВ ослабевает быстрее среди индивидов, которым во время первичной серии вводилась БКВ, а не ЦКВ [17, 28].

Эпидемиологические данные демонстрируют ослабление иммунитета среди детей школьного возраста, подростков и молодых взрослых, получивших БКВ [18, 29].

В качестве примера приведена эпидемическая ситуация, имевшая место в США в 2010 г. Эпиднадзор продемонстрировал повышение заболеваемости коклюшем среди детей в возрасте 7–10 лет, которые были вакцинированы 5 дозами БКВ. В 2010 г. в Калифорнии, штате с высоким уровнем охвата прививками детей, было зарегистрировано наибольшее число случаев коклюша за последние 52 года. Уровень заболеваемости на 100 тыс. населения составил: среди младенцев в возрасте <6 месяцев — 168 случаев; среди детей в возрасте от 7 до 9 лет — 28 случаев и среди подростков в возрасте 10–18 лет — 21 случай [30]. Эти данные позволили экспертам сделать заключение, что введение 3-дозовой первичной серии БКВ с бустерной дозой на втором году жизни, очевидно, не обеспечивает достаточную защиту детям в возрасте старше 6 лет; в этой ситуации следует вводить еще одну дополнительную бустерную дозу вакцины во время поступления ребенка в школу. Учитывая имеющиеся данные, эксперты полагают, что после введения повторной бустерной дозы ослабление иммунитета произойдет быстрее. В противоположность этому, ЦКВ, использованная в качестве первой дозы, обеспечивает более продолжительную защиту независимо от того, какая вакцина использовалась в последующем [17].

Снижение заболеваемости коклюшем в США с конца 1940-х и начала 1950-х гг. после начала применения ЦКВ (DTP) и рост заболеваемости с середины 1990-х гг., когда полностью перешли на использование БКВ (DTaP), наглядно демонстрирует диаграмма (рис. 1) [30].

Кроме США, возрождение коклюша было зарегистрировано и в некоторых других странах (Австралия, Португалия, Соединенное Королевство и др.) через несколько лет после их перехода от применения ЦКВ к БКВ [31].

Возможность возрождения коклюша была подтверждена недавно проведенными в Австралии, Англии и Уэльсе и США исследованиями по математическому моделированию. Кроме того, данные, полученные на бабуинах (модель на животных), у которых воспроизводится коклюш, как у человека, также поддержали гипотезу о том, что переход от ЦКВ к БКВ может быть ассоциирован с возрождением заболевания. При моделировании на бабуинах изучаемые БКВ защищали от заболевания, но имели ограниченную возможность предотвратить инфицирование или передачу коклюша другим животным, в то время как вакцины DTP (с ЦКВ компонентом) были эффективны в отношении как предотвращения, так и передачи заболевания [32]. Вероятно, что у людей, так же как и у нечеловекообразных приматов, бессимптомно или легко протекающая инфекция среди лиц, вакцинированных DTaP, может привести к передаче *B. pertussis* окружающим и стать причиной возникновения вспышки коклюша. В исследовании, проведенном на бабуинах, была определена роль Th1- и Th17-клеток в формировании иммунного ответа на естественное инфицирование и на введение вакцины DTP. Модель позволила установить, что ответная реакция клеток памяти Th1 и Th17 необходима для выработки стерилизующего местного иммунитета [33]. У бабуинов БКВ индуцировали более высокий ответ в виде Th2-клеток, но более низкий в виде Th1- и Th17-клеток и были менее эффективны в отношении выведения из организма возбудителя коклюша, а также в отношении предотвращения передачи инфекции.

Как отмечают эксперты ВОЗ, найденные причины возрождения коклюша оказались многообразными и варьируют по странам, но критическую роль, скорее всего, игра-

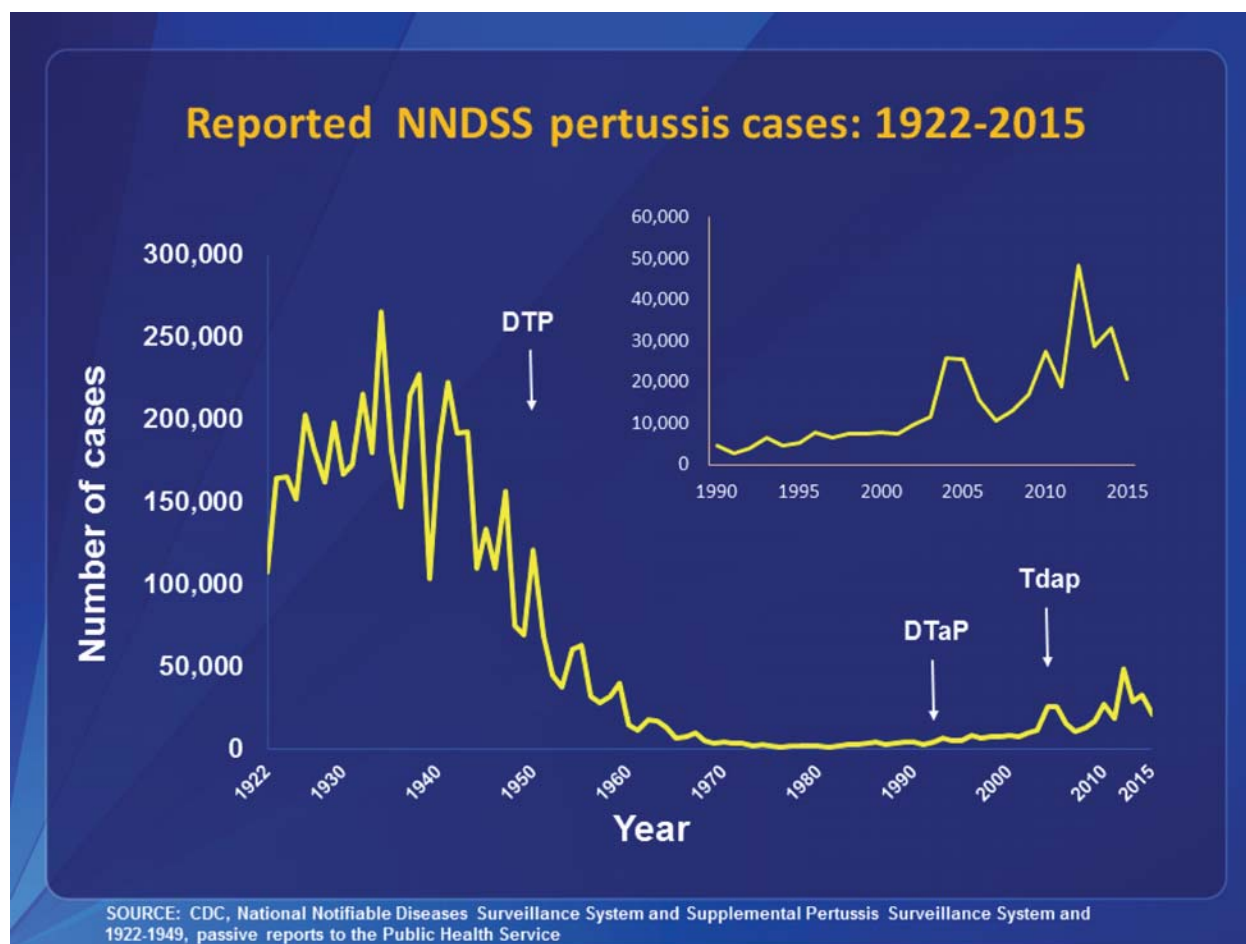


Рис. 1. Динамика заболеваемости коклюшем в США за период 1922–2015 гг. [31]; DTP — АКДС вакцина с цельноклеточным коклюшным компонентом; DTaP — АКДС вакцина с бесклеточным коклюшным компонентом; Tdap — АКДС вакцина с уменьшенным содержанием дифтерийного и бесклеточного коклюшного компонентов.

ет использование БКВ, ее короткий период защиты и слабое влияние на инфицирование и передачу инфекции [3, 31, 34, 35].

Подводя итог по представленным данным из рассматриваемых документов, необходимо отметить усилия ВОЗ, направленные на проведение вакцинации против коклюша всех детей в мире, включая и ВИЧ-позитивных. Широкий охват прививками позволит осуществить основную цель вакцинации — снизить риск возникновения тяжелых случаев коклюша среди младенцев и детей младшего возраста. Каждая страна должна стремиться к проведению ранней и своевременной вакцинации, начиная, как считает ВОЗ, с 6-недельного возраста и не позднее 8-недельного возраста, и поддерживать высокий охват ($\geq 90\%$) минимум тремя дозами вакцины гарантированного качества против коклюша.

Основной вывод и предостережение рассматриваемых документов, которые должны принять к сведению органы здравоохранения всех стран, — это опасность возрождения коклюша, связанная с широким использованием БКВ.

В связи с этим выбор коклюшной вакцины (ЦКВ или БКВ) при вакцинации играет определяющую роль в формировании иммунной прослойки населения.

Эксперты считают, что защита против тяжелых случаев коклюша в младенчестве или раннем детстве может быть получена после первичной серии вакцинации с при-

менением как ЦКВ, так и БКВ [36]. Имеющиеся данные указывают, что лицензированные БКВ и ЦКВ имеют эквивалентные показатели первичной эффективности в предотвращении заболевания в течение первого года жизни, но наблюдается более быстрое ослабление иммунитета и снижение влияния на передачу патогенного агента при применении БКВ в отличие от ЦКВ.

Поэтому ВОЗ рекомендует странам, в национальных программах которых предполагается использование ЦКВ, продолжать использовать эти вакцины для первичной вакцинации [1]. Переход от ЦКВ к БКВ для проведения первичной вакцинации младенцев следует рассматривать только при гарантии включения в национальный календарь дополнительной периодической бустерной или материнской вакцинации; это имеет значительные финансовые последствия в силу более высокой стоимости БКВ и необходимости введения большего числа доз. Более того, как отмечают эксперты, введение дополнительных доз БКВ может быть недостаточным для предотвращения возрождения коклюша. Данные эпиднадзора и моделирования позволяют ВОЗ полагать, что использование БКВ через несколько лет может привести к возрождению коклюша, и подобное возрождение может увеличить риск возникновения смертельного исхода среди детей, слишком маленьких для вакцинации. Сложно предугадать масштабы и сроки этого возрождения, принимая во внимание многие факторы, оказывающие влияние на этот процесс,

такие как охват прививками, естественный иммунитет, тип вакцины и календари прививок, оценку которых, как считают эксперты, необходимо продолжать. В связи с существующей опасностью возрождения коклюша ВОЗ подтвердила существующую политику Global Alliance for Vaccines and Immunization (GAVI Alliance) по снабжению стран только цельноклеточной вакциной против коклюша в составе комбинированной пентавакцины [3]. При этом эксперты подчеркивают, что ЦКВ является практически безопасной («very safe») [3]. Противопоказаний к применению ЦКВ и БКВ нет, кроме редких анафилактических реакций после введения этих вакцин ранее. Реактогенность ЦКВ значительно снижается при введении ее в соответствии с календарями, предусматривающими ранние сроки с короткими интервалами между дозами.

В настоящее время ситуацию с заболеваемостью коклюшем в Российской Федерации, как практически во многих странах мира, нельзя считать благополучной. Официальные цифры заболеваемости коклюшем сравнительно невысокие: например, в 2015 г. — 4,42 на 100 тыс. населения. Необходимо отметить, что истинная заболеваемость, по-видимому, отражается более высокими показателями. Это связывают с несовершенной диагностикой заболевания, несоблюдением схемы вакцинации, стертым течением заболевания у подростков и взрослых, необоснованными отводами и отказом от прививок, необъективным отражением истинной эпидемической ситуации [37–39]. Одной из основных причин, влияющих на рост заболеваемости коклюшем, является качество используемого вакцинного препарата.

Технология изготовления АКДС в России была разработана в 1960 г. коллективом под руководством профессора М. С. Захаровой в НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи и с тех пор существенно не менялась. Преимуществом отечественной ЦКВ по сравнению с аналогичными зарубежными препаратами является то, что она в своем составе содержит три штамма коклюшного микроба разных серотипов — 1.2.3, 1.0.3 и 1.2.0, взятых в равных соотношениях, и минимальное количество инактивированных коклюшных микробных клеток (20 млрд/мл по сравнению с 35–40 млрд/мл, входящими в состав зарубежных ЦКВ). Невысокое содержание клеток *B. pertussis* обеспечивает высокую иммуногенную активность и демонстрирует лучшие показатели безопасности препарата по сравнению с зарубежными аналогами [40, 41]. Широкое использование ЦКВ при высоком охвате детского населения (не менее 90 %) позволило снизить заболеваемость коклюшем в Российской Федерации по сравнению с допрививочным периодом в 150 раз [38]. Таким образом, профилактическая эффективность и безопасность отечественной АКДС вакцины с цельноклеточным коклюшным компонентом не вызывает сомнений [42]. Наблюдаемый в настоящее время рост заболеваемости коклюшем в Российской Федерации мы объясняем, помимо вышеперечисленных причин, достаточно широким использованием в нашей стране зарубежных комбинированных вакцин, содержащих БКВ. Так, вакцины Пентаксим и Тетраксим, производства фирмы «Санофи Пастер», Франция используются с 2008 и 2011 гг. соответственно. Вакцины Инфанрикс и Инфанрикс-гекса, производства фирмы «ГлассоСмитКляйн», Бельгия — с 2009 и 2011 гг. соответственно.

Необходимо отметить, что в Российской Федерации разработана новая коклюшная вакцина, которая не является цельноклеточной, и в то же время ее нельзя считать типичной бесклеточной вакциной. Разработанная вакцина

обладает полноценной антигенной структурой и содержит природный комплекс антигенов *B. pertussis* (КА, ФГА, ПРН, ФИМ2 и ФИМ3) [43]. В настоящее время отечественная бесклеточная вакцина проходит клинические исследования.

Присоединяясь к мнению отечественных исследователей, считаем необходимым для снижения заболеваемости коклюшем в Российской Федерации включение в Национальный календарь профилактических прививок второй ревакцинации. Полный курс прививок, в том числе первую ревакцинацию, целесообразно проводить как отечественными вакцинами АКДС или Бубо-Кок, содержащими цельноклеточный коклюшный компонент, вторую ревакцинацию детям 5–7 лет — комбинированными препаратами, содержащими БКВ. Такая схема обеспечит выработку как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. Кроме того, необходимо продолжать исследования, направленные на дальнейшее повышение качества как ЦКВ, так и неспецифических компонентов, входящих в состав АКДС вакцины [44], а также принятие мер и проведение мероприятий, направленных на ликвидацию причин роста заболеваемости.

Выводы

1. Выбор коклюшной вакцины (ЦКВ или БКВ) при вакцинации играет определяющую роль в формировании иммунной прослойки населения.
2. Лицензированные БКВ и ЦКВ имеют эквивалентные показатели первичной эффективности в предотвращении заболевания в течение первого года жизни, но наблюдается более быстрое ослабление иммунитета и снижение влияния на передачу патогенного агента при применении БКВ в отличие от ЦКВ.
3. Использование БКВ может привести к возрождению коклюша и, как следствие, к увеличению риска возникновения смертельного исхода среди детей, слишком малых для вакцинации.
4. Во избежание опасности возврата коклюшной инфекции рекомендуется использовать для иммунопрофилактики ЦКВ, которую эксперты ВОЗ характеризуют как практически безопасную.

Литература

1. WHO. Weekly epidemiological record. Pertussis vaccines: WHO position paper — August 2015. 2015; 90(35): 433–60.
2. WHO. Weekly epidemiological record. Pertussis vaccines: WHO position paper. 2010; 85(40): 385–400.
3. WHO Weekly epidemiological record. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization. 2014; 89(21): 221–36.
4. Report from the SAGE Working Group on Pertussis vaccines, 26–27 August 2014 meeting, Geneva, Switzerland. Available from: <https://goo.gl/MY4aWo>; accessed July 2015.
5. Edwards KM, Decker MD. Pertussis vaccines. Vaccines. 6th ed. Plotkin S, Orenstein W, Offit P, Eds. Philadelphia: Saunders, 2013; P. 447–92.
6. Crowcroft NS, Pebody RG. Recent developments in pertussis. Lancet 2006; 367(9526): 1926–36.
7. Préziosi MP, Yam A, Wassilak SG, Chabirand L, Simaga A, Ndiaye M, et al. Epidemiology of pertussis in a West African community before and after introduction of a widespread vaccination program. Am J Epidemiol. 2002; 155(10): 891–6.
8. Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/Bordetella parapertussis. Geneva, World Health Organization, Update 2014 (WHO/IPV/14.03). Available from: <https://goo.gl/74nuHj>.
9. Riffelmann M, Wirsing von König CH, Caro V, Guiso N, Pertussis PCR, Consensus Group. Nucleic acid amplification tests for diag-

- nosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(10): 4925–9.
10. Wirsing von Künig CH. The immunological basis for immunization series: module 4: pertussis — update 2009. Geneva. World Health Organization, 2010; P. 50.
 11. Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, Donegan K et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet* 2014; 384(9953): 1521–8.
 12. WHO expert committee on biological standardization. WHO technical report series, № 941. Annex 6. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. Geneva. World Health Organization; 2007. P. 301–332.
 13. Jefferson T, Rudin M, DiPietrantonj C. Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children. *Vaccine* 2003; 21: 2003–14.
 14. WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. Geneva, World Health Organization, 2003 (WHO/V&B/03.01). Available from: <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF06/843.pdf>.
 15. Simondon F, Preziosi M, Yam A, Kane CT, Chabirand L, Iteanu I et al. A randomized double-blind trial comparing a 2-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine* 1997; 15: 1606–12.
 16. Jenkinson D. Duration of effectiveness of pertussis vaccine: evidence from a 10 year community study. *BMJ* 1988; 296: 612–4.
 17. Sheridan SL, Frith K, Snelling TL, Grimwood K, McIntyre PB, Lambert SB. Waning vaccine immunity in teenagers primed with whole cell and acellular pertussis vaccine: recent epidemiology. *Exp. Rev. Vaccines* 2014; 13(9): 1081–106.
 18. Whole Cell Pertussis Vaccines: Summary of evidence relevant to schedules. Available from: <https://goo.gl/8v5z5n>; accessed July 2015.
 19. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series No. 979. Sixty-second report. Annex 4. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines. Geneva. World Health Organization, 2013. P. 187–260. Available from: <https://goo.gl/hRTF4w>.
 20. Olin P, Rasmussen F, Gustafsson L, Hallander HO, Heijbel H. Randomized controlled trial of 2-component, 3-component, and 5-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. *Lancet* 1997; 350: 1569–77.
 21. Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P, Giuliano M, Tozzi AE, Anemona A, et al. A controlled trial of 2 acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *New Engl J Med.* 1996; 334: 341–8.
 22. Schmitt HJ, von Künig CH, Neiss A, Bogaerts H, Bock HL, Schulte-Wissermann H et al. Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. *JAMA* 1996; 275(1): 37–41.
 23. Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, Storsaeter J. A controlled trial of a 2-component acellular, a 5-component acellular and a whole-cell pertussis vaccine. *New Engl J Med.* 1996; 334: 349–55.
 24. Zhang L, Prietsch S, Axelsson I, Halperin SA. Acellular vaccines for preventing whooping cough in children. The Cochrane database of systematic reviews. 2014; 9. CD001478.
 25. Carlsson R, Trollfors B. Control of pertussis—lessons learnt from a 10-year surveillance programme in Sweden. *Vaccine* 2009; 27: 5709–18.
 26. Okada K, Ohashi Y, Matsuo F, Uno S, Soh M, Nishima S. Effectiveness of an acellular pertussis vaccine in Japanese children during a non-epidemic period: matched case-control study. *Epidemiol. Infect.* 2009; 137: 124–30.
 27. Salmaso S, Mastrantonio P, Tozzi AE, Stefanelli P, Anemona A et al. Sustained efficacy during the first 6 years of life of 3-component acellular pertussis vaccines administered in infancy: the Italian experience. (Abstract). *Pediatrics.* 2001; 108(5): 1195. Available from: www.pediatrics.org/cgi/content/full/108/5/e81 PMID:11694665.
 28. Quinn HE, Snelling TL, Macartney KK, McIntyre PB. Duration of protection after first dose of acellular pertussis vaccine in infants. *Pediatrics* 2014; 133(3): e513–9.
 29. Quinn HE, McIntyre PB. Pertussis epidemiology in Australia over the decade 1995–2005 — trends by region and age group. *Communicable Diseases Intelligence* 2007; 31: 205–15.
 30. CDC. Center for Disease Control and Prevention. CDC 24/7. Available from: <https://goo.gl/WNEXrj>.
 31. WHO SAGE pertussis working group. Background paper. SAGE April 2014. Available from: <https://goo.gl/rwaUgq>.
 32. Warfel JM, Merkel TJ. Reply to Domenech de Cellus, et al.: Infection and transmission of pertussis in the baboon model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(7): E718.
 33. Warfel JM, Merkel TJ. *Bordetella pertussis* infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Imm.* 2013; 6(4): 787–96.
 34. Hong Choi Y, Campbell H, Amirthalingam G, van Hoek AJ, Miller E. Investigating the pertussis resurgence in England and Wales, and options for future control. *BMC Med.* 2016; 14: 121.
 35. Gambhir M, Clark TA, Cauchemez S, Tartof SY, Swerdlow DL, Ferguson NM. A change in vaccine efficacy and duration of protection explains recent rises in pertussis incidence in the United States (A change in efficacy and duration of pertussis vaccine). *PLoS Comput Biol.* 2015; 11(4): e1004138.
 36. Grading of scientific evidence — table 1: Efficacy/effectiveness of pertussis vaccines in immunocompetent infants and children. Available from: <https://goo.gl/SKf6HB>.
 37. Иоозфович ОВ, Харит СМ, Каплина СП, Гостев ВВ, Сидоренко СВ, Калиногорская ОС и др. Распространенность коклюша у длительно кашляющих детей 6–17 лет, привитых в раннем возрасте АКДС-вакциной. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика* 2012; (5): 56–9.
 38. Онищенко ГГ, Ежлова ЕБ, Мельникова АА. Актуальные вопросы организации вакцинопрофилактики в Российской Федерации. *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии* 2011; (5): 110–4.
 39. Онищенко ГГ, Ежлова ЕБ, Мельникова АА. Актуальные проблемы вакцинопрофилактики в Российской Федерации. *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии* 2014; (1): 9–19.
 40. Алексеева ИА, Чупринина РП, Борисова ВН. Сравнительный анализ безопасности и эффективности отечественных и зарубежных комплексных вакцин, содержащих цельноклеточную коклюшную вакцину. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика* 2012; (3): 48–54.
 41. Алексеева ИА, Чупринина РП, Перелыгина ОВ, Миронов АН. Гармонизация требований к АКДС-вакцине в проекте ФС Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2013; (1): 36–40.
 42. Профилактика и мониторинг поствакцинальных осложнений. Таточенко ВК, Федоров АМ, Озерецковский НА, ред. М., 2004.
 43. Николаева АМ, Языкова МН, Калашникова ЕА, Иванов АВ, Сперанская ВН. Изучение безопасности и антигенной структуры новой бесклеточной коклюшной вакцины. *Российский иммунологический журнал.* 2014; 8(3): 914–6.
 44. Озерецковский НА, Затолочина КЗ, Снегирева ИИ. Предложения по профилактике нежелательных реакций при применении иммунобиологических лекарственных препаратов в Российской Федерации. *Безопасность и риск фармакотерапии.* 2015; 1(6): 25–9.

Об авторах

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

Алексеева Ирина Андреевна. Главный эксперт лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук.

Перелыгина Ольга Викторовна. Начальник лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Адрес для переписки: Алексеева Ирина Андреевна; Alekseeval@expmed.ru

Comparative analysis of whole-cell and acellular pertussis vaccines efficacy in preventing pertussis

I. A. Alekseeva, O. V. Pereyagina

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

In light of the increasing incidence of pertussis in many countries much attention is paid to vaccines for immunologic prophylaxis of pertussis. The article dwells upon the use of whole-cell and acellular pertussis vaccines (DTPs and DTaPs, respectively). The analyzed materials demonstrate that the choice of the vaccine (DTP or DTaP) plays a crucial role in the creation of the proportion of the population who are immune to the disease. The wide use of DTPs in 1950s–1960s resulted in more than a 90 % decrease in pertussis incidence and mortality rates. While DTPs are very efficacious they have also been associated with a high degree of reactogenicity (especially those vaccines produced abroad since they contain half or twice as many inactivated pertussis cells as Russian vaccines). An alternative variant is DTaPs which show significantly lower reactogenicity as compared to DTPs. Available data demonstrate that licensed DTaPs and DTPs have equivalent primary efficacy in preventing the disease during the first year of life, but the effect of APVs is not as long-standing as that of DTPs and this results in a more rapid weakening of the immune system and decrease in the influence on pathogen transmission. Immune protection following the administration of DTaP booster doses decreases more rapidly in those people who received first immunization with a DTaP rather than a DTP. Experts believe that after administration of a repeat DTaP booster dose the weakening of the immunity will be still more rapid. Epidemiological surveillance data suggest that the use of DTaPs can lead to the resurgence of pertussis, and this resurgence may increase the risk of death for children who are too small to be vaccinated. This conclusion is supported by the increase in pertussis incidence in developed countries where the immunological prophylaxis is based on DTaPs only. It is important that specialists make their choice of the prophylactic vaccine based on its effect on the immunity duration and level.

Key words: whole-cell pertussis vaccine; acellular pertussis vaccine; efficacy and safety of pertussis vaccines.

For citation: Alekseeva IA, Pereyagina OV. Comparative analysis of whole-cell and acellular pertussis vaccines efficacy in preventing pertussis. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(4): 207–215.

References

1. WHO. Weekly Epidemiological Record. Pertussis vaccines: WHO position paper — August 2015. 2015; 90(35): 433–60.
2. WHO Weekly epidemiological record. Pertussis vaccines: WHO position paper. 2010; 85(40): 385–400.
3. WHO Weekly epidemiological record. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization. 2014; 89(21): 221–36.
4. Report from the SAGE Working Group on Pertussis vaccines, 26–27 August 2014 meeting, Geneva, Switzerland. Available from: <https://goo.gl/MY4aWo>.
5. Edwards KM, Decker MD. Pertussis vaccines. In: Vaccines. 6th ed. Plotkin S, Orenstein W, Offit P., eds. Philadelphia: Saunders, 2013. P. 447–492.
6. Crowcroft NS, Pebody RG. Recent developments in pertussis. *Lancet* 2006; 367(9526): 1926–36.
7. Preziosi MP, Yam A, Wassilak SG, Chabirand L, Simaga A, Ndiaye M, et al. Epidemiology of pertussis in a West African community before and after introduction of a widespread vaccination program. *Am J Epidemiol.* 2002; 155(10): 891–6.
8. Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis*. Geneva, World Health Organization, Update 2014 (WHO/IPV/14.03). Available from <https://goo.gl/74nuHj>.
9. Riffelmann M, Wirsing von König CH, Caro V, Guiso N, for the Pertussis PCR, Consensus Group. Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4925–9.
10. Wirsing von König CH. The immunological basis for immunization series: module 4: pertussis — update 2009. Geneva. World Health Organization, 2010. P. 50.
11. Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, Donegan K et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet* 2014; 384(9953): 1521–8.
12. WHO expert committee on biological standardization. WHO technical report series, № 941. Annex 6. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. Geneva. World Health Organization. 2007. P. 301–32.
13. Jefferson T, Rudin M, DiPietrantonj C. Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children. *Vaccine* 2003; 21: 2003–14.
14. WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. Geneva, World Health Organization, 2003 (WHO/V&B/03.01). Available from: <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF06/843.pdf>.
15. Simondon F, Preziosi M, Yam A, Kane CT, Chabirand L, Iteanu I et al. A randomized double-blind trial comparing a 2-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine* 1997; 15: 1606–12.
16. Jenkinson D. Duration of effectiveness of pertussis vaccine: evidence from a 10 year community study. *BMJ* 1988; 296: 612–4.
17. Sheridan SL, Frith K, Snelling TL, Grimwood K, McIntyre PB, Lambert SB. Waning vaccine immunity in teenagers primed with whole cell and acellular pertussis vaccine: recent epidemiology. *Exp Rev Vaccines* 2014; 13(9): 1081–106.
18. Whole Cell Pertussis Vaccines: Summary of evidence relevant to schedules. Available from: <https://goo.gl/8v5z5n>; accessed July 2015.
19. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series No. 979. Sixty-second report. Annex 4. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines. Geneva. World Health Organization. 2013. P. 187–260. <https://goo.gl/hRTF4w>.
20. Olin P, Rasmussen F, Gustafsson L, Hallander HO, Heijbel H. Randomised controlled trial of 2-component, 3-component, and 5-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. *Lancet* 1997; 350: 1569–77.
21. Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P, Giuliano M, Tozzi AE, Anemona A et al. A controlled trial of 2 acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *New Engl J Med.* 1996; 334: 341–8.
22. Schmitt HJ, von König CH, Neiss A, Bogaerts H, Bock HL, Schulte-Wissermann H et al. Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. *JAMA* 1996; 275(1): 37–41.
23. Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, Storsaeter J. A controlled trial of a 2-component acellular, a 5-component acellular and a whole-cell pertussis vaccine. *New Engl J Med.* 1996; 334: 349–55.
24. Zhang L, Prietsch S, Axelsson I, Halperin SA. Acellular vaccines for preventing whooping cough in children. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2014; 9: CD001478.

25. Carlsson R, Trollfors B. Control of pertussis—lessons learnt from a 10-year surveillance programme in Sweden. *Vaccine* 2009; 27: 5709–18.
26. Okada K, Ohashi Y, Matsuo F, Uno S, Soh M, Nishima S. Effectiveness of an acellular pertussis vaccine in Japanese children during a non-epidemic period: matched case-control study. *Epidemiol Infect.* 2009; 137: 124–30.
27. Salmaso S, Mastrantonio P, Tozzi AE, Stefanelli P, Anemona A, Ciofi degli Atti ML et al. Sustained efficacy during the first 6 years of life of 3-component acellular pertussis vaccines administered in infancy: the Italian experience (Abstract). *Pediatrics* 2001; 108(5): 1195. Available from: www.pediatrics.org/cgi/content/full/108/5/e81 PMID: 11694665.
28. Quinn HE, Snelling TL, Macartney KK, McIntyre PB. Duration of protection after first dose of acellular pertussis vaccine in infants. *Pediatrics* 2014; 133(3): e513–9.
29. Quinn HE, McIntyre PB. Pertussis epidemiology in Australia over the decade 1995–2005 — trends by region and age group. *Communicable Diseases Intelligence* 2007; 31: 205–15.
30. CDC. Center for Disease Control and Prevention. CDC 24/7. Available from: <https://goo.gl/WNEXrj>.
31. WHO SAGE pertussis working group. Background paper. SAGE April 2014. Available from: <https://goo.gl/rwaUgq>.
32. Warfel JM, Merkel TJ. Reply to Domenech de Celles, et al.: Infection and transmission of pertussis in the baboon model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(7): E718.
33. Warfel JM, Merkel TJ. Bordetella pertussis infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol.* 2013; 6(4): 787–96.
34. Hong Choi Y, Campbell H, Amirthalingam G, van Hoek AJ, Miller E. Investigating the pertussis resurgence in England and Wales, and options for future control. *BMC Med.* 2016; 14: 121.
35. Gambhir M, Clark TA, Cauchemez S, Tartof SY, Swerdlow DL, Ferguson NM. A change in vaccine efficacy and duration of protection explains recent rises in pertussis incidence in the United States (A change in efficacy and duration of pertussis vaccine). *PLoS Comput Biol.* 2015; 11(4): e1004138.
36. Grading of scientific evidence — table 1: Efficacy/effectiveness of pertussis vaccines in immunocompetent infants and children. Available from: <https://goo.gl/SKf6HB>.
37. Iozefovich OV, Harit SM, Kaplina SP, Gostiv VV, Sidorenko SV, Kalinogorsky OS et al. Prevalence of pertussis in long-term coughing in children 6–17 years of age, vaccinated at an early age of the DPT vaccine. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika* 2012; (5): 56–9 (in Russian).
38. Onishchenko GG, Ezhlova EB, Melnikova AA. Actual questions of organization of the vaccination in the Russian Federation. *Zhurn. mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii* 2011; (5): 110–4 (in Russian).
39. Onishchenko GG, Ezhlova EB, Melnikova AA. Current problems of vaccination in the Russian Federation. *Zhurn. mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii* 2014; (1): 9–19 (in Russian).
40. Alekseeva IA, Chuprynina RP, Borisova VN. A comparative analysis of the safety and efficiency of domestic and foreign integrated vaccines containing whole-cell pertussis vaccine. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika* 2012; (3): 48–54 (in Russian).
41. Alekseeva IA, Chuprynina RP, Pereyagina OV, Mironov AN. Harmonization of requirements of pertussis-diphtheria-tetanus vaccine in the project monograph. The vaccine pertussis-diphtheria-tetanus adsorbed. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2013; (1): 36–40 (in Russian).
42. Prevention and monitoring of post-vaccination complications. Tatchenko VK, Fedorov AM, Ozeretskovsky NA, Eds. Moscow, 2004. 189 p. (in Russian).
43. Nikolaeva AM, Yazykova MN, Kalashnikova EA, Ivanov AV, Speranskaya VN. The study of the safety and antigenic structure of the new acellular pertussis vaccine. *Rossiiskii zhurn immunoologii* 2014; 8(3): 914–6 (in Russian).
44. Ozeretskovsky NA, Zatulokina KE, Snegireva I. Suggestions for preventing undesirable reactions at application of immunobiological medicines in Russia. *Safety and Risk of Pharmacotherapy.* 2015; 1(6): 25–9 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Alekseeva IA. Chief expert of the Laboratory of Toxoids and Antitoxic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Medical Sciences.

Pereyagina OV. Head of the Laboratory of Toxoids and Antitoxic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Contact e-mail: Alekseeva Irina Andreevna; Alekseeval@expmed.ru

Основные подходы к управлению данными для администрирования биологических коллекций

Д. С. Давыдов, К. А. Кошечкин, А. А. Мовсесянц

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

Поступила 25.01.2017 г. Принята к публикации 26.10.2017 г.

Проведен анализ основных принципов и подходов к использованию программно-технических решений и платформ, применение которых возможно при разработке систем управления данными в биологических коллекциях. Сформулированы основные требования к функциональным возможностям программного обеспечения, предназначенного для поддержки баз данных по биологическим ресурсам и являющегося необходимым атрибутом функционирования биологической коллекции высокого организационного уровня. Рассмотрены основные подходы к ограничению доступа к информации о биологических коллекциях в случаях, предусмотренных патентной процедурой и правилами биологической безопасности. Определены особенности разработки систем информационного обеспечения открытых сервисных биологических коллекций.

Ключевые слова: базы данных; система управления качеством; сбор и обработка информации; биологические коллекции; стандартные биологические образцы.

Библиографическое описание: Давыдов ДС, Кошечкин КА, Мовсесянц АА. Основные подходы к управлению данными для администрирования биологических коллекций. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2017; 17(4): 216–221.

Постоянное истощение природных ресурсов, актуальные угрозы биологической безопасности и изменения климата, снижение продуктивности традиционных таксономических исследований, увеличение потребности в инновационных методах и технологиях исследований способствуют все более четкому пониманию исключительной ценности биологических коллекций. Сохранение генетических ресурсов и биологического разнообразия подводит надежное основание под развитие экологически эффективных технологий и производств как в развитых странах, так и в странах развивающегося мира. Это необходимый аспект развития наукоемкой экономики, одним из ведущих направлений в которой являются биотехнологии.

Совершенствование методических подходов к осуществлению коллекционной деятельности и развитие биоресурсного потенциала входят в число основных задач Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года, утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 24.04.2012 г. № 853п-П8, и неотъемлемы от одного из главных приоритетов развития биотехнологий, к которым относятся биофармацевтика и биомедицина. Реализация комплекса мероприятий по данному направлению запланирована в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 17.02.2011 г. № 91. Основной задачей по данному направлению является создание материальной и организационной инфраструктуры для обеспечения деятельности биологических коллекций, в том числе коллекций микроорганизмов, функционирующих в Российской Федерации, в соответствии с международными нормативно-методиче-

скими требованиями, предъявляемыми к биоресурсным центрам, которые являются базовым элементом развития биотехнологий [1].

Одним из важнейших аспектов надлежащей практики коллекционной деятельности, связанной с пополнением фонда биоресурсов, хранением и изучением микроорганизмов, является наличие комплексной системы управления данными. В Российской Федерации работы в этом направлении велись в рамках выполнения программы фундаментальных исследований Российской академии наук «Биоразнообразие и динамика генофондов». Ведущим исполнителем работ являлась Всероссийская коллекция микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН (ВКМ ИБФМ РАН), а в качестве соисполнителей выступали 17 российских коллекций. Был подготовлен в электронном виде объединенный каталог Российских коллекций немедицинского профиля. Была подготовлена и представлена в формате XML (Extensible Markup Language) часть каталога Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) [2–4].

Окончательный вариант электронной версии Объединенного каталога (Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. CD version, release 1.0 (Fall 2002)) был размещен в сети Интернет на web-сайте ВКМ в формате электронной книги MS eReader в 5 томах на английском языке [5].

Также в открытом доступе находятся отдельные разделы каталогов ряда ведущих международных биологических коллекций, в том числе Американской коллекции типовых культур (ATCC), Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) и Национальной коллекции типовых культур (NCTC, Великобритания).

Однако форма этих каталогов удобна лишь с точки зрения поиска микроорганизмов по номеру штамма и не позволяет подбирать их по целевым характеристикам.

Создание полноценной базы данных (БД) как инструмента для проведения многофакторного анализа коллекционных штаммов является одной из приоритетных задач коллекционной деятельности. При этом данные литературы по разработкам баз данных комплексной структуры, направленных на каталогизацию патогенных микроорганизмов, крайне малочисленны и фрагментарны, что указывает на высокую актуальность и приоритетность разработок, ведущихся в этом направлении.

Целью настоящей статьи является краткий обзор основных принципов и подходов к использованию программно-технических решений и платформ, применение которых возможно при разработке систем управления данными в биологических коллекциях.

1. Основные типы программных решений для управления данными

1.1. Управление информацией с применением web-приложений

Использование интернет-приложений для информационного обеспечения биоресурсных центров обеспечивает возможность доступа к данным практически из любой точки мира с использования широчайшего спектра электронных устройств. Данные приложения отличаются максимальной простотой при проведении базовых операций и легкостью обслуживания IT-подразделениями, так как все программное обеспечение (ПО) загружается, устанавливается и администрируется централизованно. Нет необходимости в установке специального ПО на оборудование, используемого кураторами коллекций, так как доступ к информации обеспечивается через браузер. Кроме того, одним из существенных преимуществ web-приложений является возможность использования одной программной платформы как для управления информацией, так и для публикации данных.

Следствием главного преимущества web-приложений (легкость и мобильность доступа к данным) является главная проблема их применения, а именно — задачи обеспечения информационной безопасности использования web-приложений имеют принципиально более сложный и комплексный характер по сравнению с настольными приложениями, так как данные программы потенциально могут быть доступны для неограниченно широкого круга лиц и с любого устройства. Кроме того, web-приложения обычно зависимы от наличия постоянного и скоростного интернет-подключения и интенсивного технического сопровождения и обслуживания для того, чтобы новые версии браузеров обеспечивали функциональность приложения на должном уровне. Часто возникают трудности обеспечения сохранности вносимых изменений в БД при нарушениях подключения.

К недостаткам данного вида программных продуктов можно также отнести высокую стоимость разработки, сложность обеспечения поддержки возможности доступа с различных браузеров и их версий. Поддержка ряда функций баз данных как высокого, так и базового уровня, для web-приложений может быть сильно осложнена или невозможна, например, поддержка многокомпонентного интерфейса и одновременного выполнения операций, требующих больших объемов памяти. Имеются существенные ограничения взаимодействия с другим программным обеспечением.

1.2. Использование автономных приложений (desktop applications, DA)

Альтернативой использования web-приложений является применение автономных приложений (desktop applications, DA). Их отличает богатый программный интерфейс, возможность конвейерной передачи данных между рабочими областями, возможность взаимодействия с другим программным обеспечением и создания двусторонней передачи информации, высокая производительность и относительная легкость выполнения операций, требующих большой оперативной памяти и сложного интерфейса (основные ограничения могут быть связаны только с особенностями операционной системы, техническими характеристиками ПК и т.д.), легкость использования и высокая скорость ответа на команды и запросы пользователя. Они не вызывают дополнительных трудностей при разработке в части основных функциональных возможностей. Также их характеризует относительная простота обеспечения безопасности доступа к данным.

Существенными недостатками данного вида приложений является часто отмечаемая невозможность использования одной программы на ПК с различными операционными системами, невозможность перехода между MS Windows, Mac OS или Linux, а также сложности при установке ПО (требования к операционным системам, необходимость наличия файлов динамически компонуемой библиотеки *.dll* и др.) Как правило, отсутствует возможность удаленного доступа с ПК и других устройств. При установке данного типа ПО более, чем на одном ПК часто могут возникать большие затруднения при внесении новой информации в БД и модификации программы, в том числе при ее апгрейде, устранении программных ошибок («bug fixing»), установке новых версий. Также сложность обновления связана с необходимостью авторизованной рассылки обновлений производителем ПО на физических носителях, что представляет для отделов технического обеспечения коллекций дополнительную задачу по логистике и требует дополнительных финансовых расходов, часто существенных.

В целом можно констатировать, что автономные приложения не имеют единого алгоритма действия, сложны в обслуживании для IT-специалистов и имеют высокую стоимость, в том числе для обновлений программы и базы данных при условии ограничений по количеству лицензий на установку.

1.3. Самостоятельная разработка программного обеспечения для внутреннего пользования

В теории самостоятельная разработка программного обеспечения дает организации, ведущей коллекционную деятельность, возможность создания приложения, максимально соответствующего потребностям ответственных сотрудников коллекции (по крайней мере, на момент разработки программы). Также самостоятельная разработка обеспечивает высокую скорость устранения ошибок и сбоев программы, а также внедрения новых опций. При условии наличия в штате организации стабильной по составу команды высокопрофессиональных специалистов в области программирования, разработки, особенно на ранних этапах, проходят относительно просто и быстро. Также «hand-made ПО» отличается относительно невысокой стоимостью разработки — при условии сохранения простой структуры приложения и ограниченной функциональности в процессе применения.

Многие биологические коллекции начинают внедрять системный подход к управлению данными с использованием самостоятельно разработанного ПО, однако в действительности подобные разработки практически никогда не имеют успешного применения для обеспечения нужд коллекций. Тому есть несколько веских причин.

Во-первых, сотрудники, курирующие БД и использующие ее в своей научно-исследовательской работе, крайне редко являются квалифицированными специалистами в области разработки ПО и программирования и это делает использование готовой программы, ее обслуживание и усовершенствование крайне затруднительными, тогда как профессионалы в области разработки программных средств практически недоступны для биологической коллекции, так как их услуги весьма высоко оплачиваются.

Во-вторых, даже при возможности привлечения к разработке ПО специалиста высокого уровня из числа сотрудников организации велика вероятность его перехода на новое место работы — и в этом случае БД остается без технического обслуживания и без перспектив усовершенствования. Возникает необходимость искать специалиста в области программирования с учетом специфики разработанного программного продукта, что может создавать значительные затруднения. При этом для вновь поступившего специалиста проще разработать ПО «с нуля», нежели разбираться в тонкостях авторского произведения. И это неизбежно приведет к новым значительным затратам времени и средств.

В-третьих, при необходимости разработки и внедрения в практику ПО комплексного типа, с широкими функциональными характеристиками и возможностью интегрированного применения в сочетании с другими программами стоимость работ становится экстремально высокой.

В-четвертых, подавляющее большинство решений подобного типа не является масштабируемым ПО, то есть апгрейд, модификация, внесение новых разделов, заполняемых форм, алгоритмов обработки данных и прочее в соответствии с новыми требованиями невозможно без нарушения структуры их операций (например, расщепления данных на более мелкие фрагменты). Это неизбежно приводит к критическому снижению их эффективности, и, как следствие — к необходимости внести изменения в структуру или даже полностью переписать приложение. Таким образом, не обеспечивается стабильность пользовательского интерфейса, что является одним из ключевых требований к любому программному продукту.

В-пятых, период от начала разработки подобных приложений до момента получения пригодной к использованию стабильной версии часто бывает очень длительным, особенно при малой численности команды разработчиков.

Часто после нескольких месяцев использования данные приложения выходят из эксплуатации по причине накопления программных ошибок и значительного снижения производительности, становясь слишком медленными, нестабильными, «недружелюбными» к пользователю. И это — достаточно обычная ситуация для биологических коллекций.

1.4. Использование коммерческих программных продуктов

К безусловным доводам в пользу выбора специализированных коммерческих программ относится широкий спектр доступных вариантов. BioloMICS, Bionumerics, FileMaker Pro, GENEious, iCollect, KE Emu, LabCollector LIMS, MuseumPlus и ряд других программных продуктов,

а также адаптированные дериваты MS Access или Oracle имеют опыт успешного применения, обладают высоким качеством и большими функциональными возможностями. Гарантирована техподдержка со стороны разработчиков, имеется возможность разработки приложений под заказ с учетом всех потребностей пользователя и специфики задач конкретной коллекции на высоком профессиональном уровне.

В то же время де-факто не существует доступных приложений, которые могут служить комплексным решением для биологических коллекций. Данные программы обладают очень высокой стоимостью, при этом, в большинстве случаев, неадаптивны, для них характерно отсутствие гибкости структуры, невозможность ее изменения, использования дополнений и расширений. И, что очень важно, к разработке редко привлекаются специалисты, имеющие профессиональный опыт в области биологических дисциплин.

1.5. Использование бесплатного ПО или программ с открытыми исходными кодами

Программы с открытыми исходными кодами (OSS) — программы, которые лицензируются с условием, что лицензиат получает возможность распоряжаться исходным кодом. В лицензиях на ПО с открытыми исходными кодами, например, от бесплатных программ (FSS), лицензиату обычно предоставляется право создавать модифицированные версии программы и распространять их исходный код — если это будет делаться на аналогичных условиях для последующих получателей кода. Такие ограничения введены во избежание коммерческого использования программ с открытым исходным кодом.

Доступно большое количество программных продуктов данного типа. Имеются очень высококачественные программы с широкими функциональными возможностями, предназначенные для продвинутых пользователей. Например, семейство программ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, предназначено для поиска гомологов белков или нуклеиновых кислот, для которых известна первичная структура (последовательность) или ее фрагмент) [6], Geneious, Mantis, RasMol, Scrathpads, SeqView, Serial Cloner, Specify, WDCM workbench и т.д. Как правило, данные программы разработаны с участием специалистов в области естественных наук, они абсолютно бесплатны и не требуют никаких дополнительных накладных расходов. Разработчики часто предоставляют бесплатные обновления и дополнения. Время использования и количество пользователей неограниченно.

Данное ПО очень хорошо подходит для коллекций, в штате ведущей организации которых имеется мощная поддержка IT-отдела и специалистов в области программирования. При этом нередко существует возможность самостоятельной разработки силами пользователей дополнений и модификаций для приложений, которые позволяют расширить функциональные характеристики стандартного интерфейса и настроить его под конкретные потребности и специфику работы конкретной коллекции.

Однако в настоящее время не существует доступных приложений, которые обеспечивали бы биологические коллекции возможностью ведения комплексных баз данных. Все приложения подобного типа являются строго специализированными и предназначены для использования, преимущественно, исследователями — специалистами в определенных областях молекулярной биологии и генетики, а также их коммуникации.

По умолчанию отсутствует возможность конвейерной передачи информации между рабочими областями; перенос массивов информации очень неудобен для пользователя. Техническая поддержка со стороны производителя в случае возникновения программных ошибок или проблем с использованием приложения практически отсутствует. При этом программные сбои, а особенно затруднения во взаимодействии с интерфейсом приложения, возникают часто. В целом данные приложения характеризует трудный в использовании интерфейс, работа с ним требует навыка и подготовки. Наконец, на практике совместное использование ПО часто бывает невозможно.

1.6. Решения, связанные с внешним размещением данных («облака»)

Данные приложения, безусловно, очень удобны как для пользователей, так и для IT-специалистов. Необходимость инсталляции отсутствует. При использовании «облачных» технологий гарантированы очень быстрый и надежный доступ, в любое время, с любого устройства (ПК, смартфон, планшет и т.д.), особенно при условии качественной IT-инфраструктуры провайдера услуги и при использовании современных технологий виртуализации, например, Citrix, удобство обслуживания и поддержки программных платформ и баз данных. Нет необходимости в приобретении собственного аппаратно-технического комплекса (сервер, локальная сеть с архитектурой «сервер-хранилище данных» /SAN/, межсетевые экраны и т.д.). Также нет необходимости в приобретении, установке и обслуживании дорогостоящего и сложного ПО для управления и мониторинга состояния системы (VMWare, vSphere и т.д.), а также включения в штат большого количества IT-специалистов. Проводится постоянный мониторинг состояния системы и техническая поддержка со стороны провайдера услуг. Гарантировано существенное уменьшение расходов в сравнении с эксплуатацией собственной инфраструктуры. Наконец, ПО, предназначенное для поддержки баз данных биологической коллекции, напрямую коммуницируется с web-сайтом, который используется для публикации данных коллекции.

Недостатки данных приложений имеют в своей основе те же причины и особенности, что и web-приложения, главные из которых — абсолютная зависимость от хостинговой организации, необходимость постоянного высокоскоростного устойчивого интернет-соединения, отсутствие возможности мониторинга и администрирования систем обеспечения безопасности и сохранности информации, хранящейся на внешнем сервере. Доступ к ядру системы управления базами данных, как правило, закрыт, за исключением возможности периодического запроса на создание полных резервных и дельта-резервных копий баз данных. Кроме того, существует необходимость регулярных платежей за услуги провайдера, что требует выделения отдельной статьи в годовом бюджете.

Таким образом, можно констатировать, что идеально-го организационно-технического решения для управления данными в биологических коллекциях не существует. Тем не менее, при условии внимательного изучения специфики задач и особенностей организации деятельности любой коллекции оптимальное решение подобрать можно, главное — понять и подробно и точно сформулировать требования к системе управления данными. Выбор решения должен основываться на техническом оснащении IT-инфраструктуры организации, а также на наличии со-

трудников и их квалификации, занимающихся информационными технологиями.

II. Основные требования к функциональным возможностям баз данных биологических коллекций

Итак, попытаемся обобщить данные, приведенные выше, и кратко сформулировать основные требования к функциональным возможностям программного обеспечения, предназначенного для поддержки баз данных по биологическим ресурсам и являющегося необходимым атрибутом функционирования биологической коллекции высокого организационного уровня. Требованиями к функциональным возможностям программного обеспечения являются:

1. Контроль перемещения штаммов и их образцов, обеспечение полной информации о процедурах движения и передачи биологических образцов, особенно патогенных биологических агентов.
2. Управление хранением коллекционного фонда, надежная система контроля и ограничения доступа.
3. Контроль всех производственно-технологических процессов при наработке и контроле качества биологических образцов.
4. Обеспечение функций комплексного мониторинга и скрининга коллекционного фонда.
5. Возможность интегрирования в единую лабораторную информационную систему (LIMS) организации.
6. Возможность создания пользовательских шаблонов бланков и заполняемых форм, таких как паспорта штаммов, сертификаты анализа, этикетки для маркировки образцов, вариативно komponуемые каталоги, сопроводительные документы для перемещения коллекционных образцов и т.д.
7. Регистрация результатов изучения и корректирования таксономической номенклатуры, данных по результатам многофазных исследований и классификации штаммов по культурально-морфологическим, тинкториальным свойствам, физиологии и биохимии.
8. Документирование и прослеживаемость всех этапов исследований. Для молекулярно-генетических методов — регенерация коллекционных образцов, подготовка образца ДНК, ПЦР, гель-хроматография, визуализация результатов секвенирования, параллельное размещение согласованной последовательности в базе данных и он-лайн каталоге.
9. Наличие библиотеки типовых штаммов.
10. Структура БД должна быть гибкой и динамичной, т.е. необходима возможность внесения/изменения данных, изменения структуры БД кураторами и другими ответственными сотрудниками коллекции без привлечения сотрудников IT-подразделений и/или представителей разработчика ПО.
11. Прослеживаемость данных о каждом доступе, сеансе работы, внесении любых изменений каждым авторизованным пользователем.
12. Возможность импорта и экспорта данных в различных форматах, таких как MS Excel, HTML, XML, FASTA, NCBI и т.д., текстовые файлы, графические/точечные изображения, таблицы, диаграммы, хроматограммы, данные микропланшетных ридеров и др.
13. Возможность прописывания ссылок и/или импорт-экспорт данных на международных авторизованных интернет-порталах, таких как StrainInfo, NCBI, GBIF и т.д.

14. Наличие средства написания сценариев и средства устранения ошибок и отладки для автоматизации администратором типовых процедур обработки данных и событий с использованием пакетного режима и создания собственных утилит командной строки и расширения функциональности ПО в соответствии с вновь возникающими потребностями пользователей.

15. Интеграция новых сценариев в существующие меню без изменения структуры интерфейса приложения.

16. Предустановленная система управления информационным наполнением (CMS) для соответствия контента в базах данных, авторизованных коммуникационных устройствах и на web-сайтах, где размещаются данные биологической коллекции.

17. Наличие программных средств кластерного анализа методами молекулярной филогенетики, в том числе методами одиночной и полной связи (single-complete linkage), методами попарного внутригруппового (не-) взвешенного среднего (UPGMA, WPGMA), методом объединения соседних пар (neighbour-joining method) [7] и т.д.

18. Возможность построения дендрограмм.

III. Дополнительные требования к базам данных сервисных биологических коллекций

Если биологическая коллекция является публичной и сервисной, предоставляя различные услуги по поставке биологических образцов, депонированию охраноспособных штаммов в целях патентной экспертизы, проведению научно-исследовательских работ, то комплексная система управления данными должна стать оптимальным, мультифункциональным средством коммуникации с организациями-клиентами и конечными пользователями.

В этом случае к системе информационного обеспечения коллекции могут предъявляться следующие требования:

1. Прямой доступ к публичным данным.
2. Простое и быстрое размещение новых данных.
3. Возможность авторизованного доступа пользователей к информации ограниченного распространения.
4. Интуитивно понятный интерфейс, удобные формы для использования контента.
5. Удобство коммуникации клиентов и конечных потребителей как с коллекцией, так и между собой. Web-страницы не должны быть перегружены, должна функционировать система перекрестных ссылок, желательно наличие форумов, новостного сервиса, FAQ-раздела, посвященного рассмотрению вопросов, наиболее часто задаваемых (FAQ) пользователями коллекций.
6. Наличие кабинета клиента, возможность оформления заявки на образцы через форму, использующую алгоритм построения бинарного дерева решений (CART System), легкое составление и изменение спецификации заявки, отсутствие необходимости для зарегистрированных пользователей каждый раз вносить личные данные и реквизиты организации.
7. Удобная и быстрая связь с кураторами коллекции и ответственными сотрудниками отдела продаж/сбыта. Наличие форм обратной связи, бланков с функциями автозаполнения.
8. Возможность доступа уполномоченных сотрудников ко всей необходимой информации о подготовке договоров, счетов и другой документации, наличии оплаты, этапах работ, стадиях их выполнения. Также вся необходимая информация должна быть доступна в кабинете пользователя.

9. При развитии взаимодействия с другими коллекциями возможно увеличение трафика с помощью использования так называемой «friendly URL» и таких протоколов доступа, как REST, SOAP и т.д.

Данные характеристики системы управления необходимы для удобства всех сторон — коллекции, клиентов и пользователей. Для конечного потребителя также могут быть необходимы или весьма желательны следующие опции:

1. Возможность поиска штаммов по максимально большому перечню характеристик.
2. Расширенная поисковая система с возможностью обработки и группировки запросов по атрибутам «и», «или», «не».
3. Удобство копирования и вставки текста, возможность выделения и переноса данных как вручную, так и посредством web-сервисов.
4. Возможность сравнительного изучения результатов полифазных исследований, проведенных в рамках идентификации, классификации, типирования штамма, доступность геномных профилей, определенных с помощью MLST, MLVA и других методов, возможность попарного параллельного сравнения ДНК или аминокислотных последовательностей коллекционных штаммов в сравнении с референс-образцами и пр.

5. Возможность получения и обмена информацией в соответствии с международными стандартами протоколов, в том числе GSC (Genomic Standards Consortium, <http://www.gensc.org/>), TDWG (Taxonomic Databases Working Group, Biodiversity Information Standards, <http://www.tdwg.org/about-tdwg/>), BioSharing и т.д.

6. Наличие внешних ссылок на данные, содержащиеся в других таксономических порталах и центрах, таких как StrainInfo, WDCM, GBIF, DSMZ, INSDC (NCBI, ENBL, DDBJ), LifeWatch, BioVel, Vibrant, LifeLink, Elixir, Q-Bank.

Выводы

Обеспечение эффективности поддержания и управления биологической коллекцией является исключительно трудной задачей, предъявляющей повышенные требования к ответственным исполнителям. Управление данными является одним из ключевых элементов системы качества биологической коллекции и совершенно необходимо для полноценного исполнения функциональных обязанностей и решения задач коллекции, при этом от сотрудников коллекции требуется повышенная степень знаний в соответствующих областях, наличие опыта и специальной подготовки. В то же время достигнутый уровень развития программно-технического обеспечения в области управления данными и перспективы дальнейших разработок представляют любой биологической коллекции, при наличии должной квалификации персонала, возможность выхода на принципиально новый уровень сложности целей и задач и выполнения их в соответствии с международными стандартами качества и требованиями, предъявляемыми к биологическим коллекциям.

Литература

1. «ВП-П8-2322. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года» (утв. Правительством Российской Федерации 24.04.2012 г. № 1853п-П8).
2. Онищенко ГГ, Кутырев ВВ, Топорков АВ, Осин АВ. Современное состояние коллекционной деятельности, связанной с

- использованием возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности. Проблемы особо опасных инфекций 2010; 1(103): 5–10.
3. Объединенный каталог Российских коллекций немедицинского профиля. 2002. Available from: <https://goo.gl/kdZmRD>.
 4. Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ). Федеральное агентство научных организаций Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Г. К. Скрыбина РАН. Available from: <http://www.vkm.ru>.
 5. Объединенный каталог Российских биологических коллекций микроорганизмов. Научно-исследовательский институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН Available from: <http://www.sevin.ru/collection/microcoll/consolidated.html>.
 6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990; 215(3): 403–10.
 7. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987; 4(4): 406–25.

Об авторах

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

Давыдов Дмитрий Сергеевич. Начальник лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Кошечкин Константин Николаевич. Начальник управления информатизации, канд. биол. наук.

Мовсесянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Давыдов Дмитрий Сергеевич; Davydov@expmed.ru

Basic approaches to data management for administration of biological collections

D. S. Davydov, K. A. Koshechkin, A. A. Movsesyants

Federal State Budgetary Institution

«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»

of the Ministry of Health of the Russian Federation,

Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

The article analyses the main principles of and approaches to software and hardware solutions and platforms that could be used in the development of data management systems for biological collections. The authors summarise the key requirements for functional capabilities of the software which could be used to support biological resources databases and which is a prerequisite for maintaining a highly organized biological collection. The article sums up the main approaches to restricting access to information on biological collections as required by the patent procedure and biological safety principles. The authors identified specific aspects of developing information support systems for public biological collections.

Key words: databases; quality management system; data acquisition and processing; biological collections; biological reference materials.

For citation: Davydov DS, Koshechkin KA, Movsesyants AA. Basic approaches to data management for administration of biological collections. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(4): 216–221.

References

1. VP-P8-2322. The comprehensive program of development of biotechnologies in the Russian Federation until 2020 (approved by the Government of the Russian Federation on April 24, 2012 № 1853p-P8) (in Russian).
2. Onishenko GG, Kutyrev VV, Toporkov AV, Ossin AV. Current state of collection activity relative to the use of infectious agents of I–II pathogenicity groups. Problems of Particularly Dangerous Infections 2010; 1(103): 5–10 (in Russian).
3. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. 2002. Available from: <https://goo.gl/kdZmRD> (in Russian).
4. All-Russian Collection of Microorganisms — VKM. Russian Academy of Sciences. G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms. Available from: <http://www.vkm.ru>.
5. All-Russian catalogue of culture collections. A. N. Severtsov Institute of ecology and evolution Russian academy of sciences. Available from: <http://www.sevin.ru/collection/microcoll/consolidated.html> (in Russian).
6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990; 215(3): 403–10.
7. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987; 4(4): 406–25.

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Davydov DS. Head of the Laboratory of Bacteriophages and Normal Flora Preparations with the Collection of Microorganisms of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Koshechkin KA. Head of Informatization Division. Candidate of Biological Sciences.

Movsesyants AA. Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Medical Sciences, professor.

Contact e-mail: Davydov Dmitrii Sergeevich; Davydov@expmed.ru

Международный опыт стандартизации препаратов аллергенов

Л. В. Невская, Е. И. Лавренчик, М. Ю. Жданова, О. В. Фадейкина, В. К. Капитанова

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

Поступила 04.07.2017 г. Принята к публикации 26.10.2017 г.

Показано, что безопасное и эффективное применение препаратов аллергенов, используемых в диагностике и терапии аллергических заболеваний, зависит от стандартизации и методов контроля их качества. В статье рассмотрены различные подходы к стандартизации препаратов аллергенов, применяемые в США, Евросоюзе и России. Неоднородность исходного сырья, используемого при производстве природных препаратов аллергенов, необходимо учитывать при формировании требований для их стандартизации, поскольку экстракты нативных аллергенов представляют собой сложный белково-полисахаридный комплекс, состоящий из аллергенных (главных и второстепенных) и неаллергенных компонентов. Для стандартизации методов оценки активности препаратов аллергенов используют стандартные образцы. На сегодняшний день в стандартизации аллергенов существуют несколько подходов — в США внедряется система национальных стандартных образцов, биологическая активность которых определена одной методикой (метод внутрикожных разведений — ID₅₀EAL), в Европе каждая фирма-производитель создает собственные внутренние стандарты (IHRS) со своими единицами активности. Препараты, выпускаемые в Российской Федерации, стандартизованы в единицах белкового азота.

Ключевые слова: аллергены; препараты аллергенов; главные аллергены; стандартизация; стандарты; биологическая активность; единицы активности.

Библиографическое описание: Невская ЛВ, Лавренчик ЕИ, Жданова МЮ, Фадейкина ОВ, Капитанова ВК. Международный опыт стандартизации препаратов аллергенов. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(4): 222–229.

Безопасное и эффективное применение препаратов аллергенов, используемых в диагностике и терапии аллергических заболеваний, зависит от стандартизации и методов контроля их качества. В настоящей статье рассмотрены различные подходы к стандартизации препаратов аллергенов, применяемые в США, Евросоюзе и России.

Аллергены из природного сырья (пыльца растений, эпителий животных, клещи домашней пыли, пищевые продукты и др.) получают с помощью экстракции, используя водно-солевые буферные растворы. Экстракты нативных аллергенов представляют собой сложные белково-полисахаридные комплексы, состоящие из аллергенных и неаллергенных компонентов. Аллергенные компоненты, в свою очередь, делятся на главные и второстепенные, их соотношение определяет биологическую активность препарата [1, 2]. В таблице 1 приведены сведения по содержанию и активности главных аллергенов в препаратах, показавших терапевтическую эффективность при лечении аллергических заболеваний различной этиологии.

Таким образом, неоднородность исходного сырья, используемого при производстве природных препаратов аллергенов, необходимо учитывать при формировании требований для их стандартизации. До 90-х годов XX века в России и за рубежом препараты аллергенов были стандартизованы по содержанию белка и тестировались *in vivo* (кожные пробы) на пациентах, чувствительных к исследуемому аллергену, поскольку количество белка не всегда коррелирует с биологической активностью [13].

Для стандартизации методов оценки активности препаратов аллергенов и перехода на использование методов *in vitro* была предпринята попытка по созданию Международных стандартных образцов (МСО), в результате которой получено 5 МСО экстрактов аллергенов [14] и

2 стандартных образца главных аллергенов [15–17]. Разработанные стандартные образцы рекомендованы для сравнения препаратов от разных производителей, а также разных серий одной фирмы при условии, что используемые методики прошли процедуру валидации [18]. В настоящее время работы в этом направлении продолжают, но имеются сложности из-за отсутствия согласия между американскими и европейскими регуляторными органами.

В США вопросами стандартизации аллергенов занимается Центр по биологической оценке и исследованиям (Center for Biologics Evaluation and Research, CBER) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA). Стандартизация аллергенов рассматривается как комплекс процедур, направленный на оценку активности лечебных препаратов аллергенов стандартными методами и минимизацию различий между сериями препаратов не только внутри одного производства, но и между разными производителями [19] с целью обеспечения взаимозаменяемости препаратов разных производителей. Для этого CBER разработал кодекс правил, в 21 разделе которого (part 680 of Title 21 of the Code of Federal Regulations — 21 CFR 680) представлены требования, предъявляемые к американскому стандартному образцу аллергенной активности, и рекомендованы методы для его оценки [20–22].

В качестве стандартного образца активности используют одну из серий аллергенного экстракта (эталонная серия), выпускаемого на предприятии, общую аллергенную активность которого оценивают в биоэквивалентных единицах (bioequivalent allergen units, BAU) [23]. Терапевтическая эффективность этой серии также должна быть подтверждена. Эталонная серия должна быть охарактеризована либо по общей аллергенной активности, либо по

содержанию главных аллергенов (аллергены из пыльцы амброзии, из шерсти или эпителия кошки). В аллергенах из яда насекомых проводится оценка ферментативной активности. Для первоначальной оценки общей аллергенной активности CBER рекомендует использовать внутрикожные тесты на пациентах с аллергическими заболеваниями. Эталонную серию тестируют в трех разведениях. Через 15 мин измеряют ортогональные (максимальный и минимальный) диаметры эритемы, вызванной данным разведением аллергена, которые затем суммируют и вычисляют логарифм дозы, при которой сумма диаметров равна 50 мм (D_{50}). 100000 BAU эквиваленты разведению

аллергена 3^{-14} , при котором достигается значение D_{50} (метод внутрикожных разведений ID_{50} EAL (IntraDermal dilution for 50 mm sum of Erythema determines the bioequivalent ALlergy units)) [24]. Для оценки активности последующих серий стандартного образца, а также коммерческих серий препаратов, кожное тестирование можно заменить подходящим тестом *in vitro*, который зарегистрирован CBER (табл. 2). Выбор теста определяется природой аллергена (конкурентный иммуноанализ, белок по Кьельдалю, радиальная иммунодиффузия и т.п.). Результаты теста *in vitro* должны коррелировать с методом внутрикожных разведений ID_{50} EAL [25].

Таблица 1. Содержание главных аллергенов в препаратах, полученных из нативных экстрактов

Наименование нативного аллергена	Главный аллерген	Содержание главного аллергена		Источник литературы
		мкг	Общая аллергенная активность (bioequivalent allergen units/ allergen units — BAU/AU)	
Аллерген из шерсти или эпителия кошки (<i>Felis domesticus</i>)	Fel d 1	14,6	2500	[3–6]
Аллерген из клещей домашней пыли Дерматофагоидес farina (<i>Dermatophagoides farinae</i>)	Der f 1	9,8	740	[7, 8]
Аллерген из клещей домашней пыли Дерматофагоидес птерониссинус (<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>)	Der p 1	13,8	2628	
Аллерген из пыльцы амброзии полыннолистной (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>)	Amb a 1	10,0	3000	[9]
Аллерген из пыльцы плевела многолетнего (<i>Lolium perenne</i>)	Lol p 5	12,5	3948	[10–12]
Аллерген из пыльцы тимopheевки луговой (<i>Phleum pratense</i>)	Phl p 5	20,2	5220	
Аллерген из пыльцы ежи сборной (<i>Dactylis glomerata</i>)	Dac g 5	12,0	2956	
Аллерген из пыльцы овсяницы луговой (<i>Festuca elatior</i>)	Dac g 5	18,6	12568	

Таблица 2. Методы *in vitro*, используемые для стандартизации аллергенов в США

№/п	Название нативного аллергена	Тест <i>in vitro</i>
1.	Аллерген из клещей домашней пыли Дерматофагоидес farina (<i>Dermatophagoides farinae</i>)	Конкурентный иммуноанализ
2.	Аллерген из клещей домашней пыли Дерматофагоидес птерониссинус (<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>)	Определение общего белка
3.	Аллерген из шерсти кошки (<i>Felis domesticus</i>)	Радиальная иммунодиффузия (Fel d 1) Изоэлектрическое фокусирование (Fel d 1, альбумин)
4.	Аллерген из эпителия кошки (<i>Felis domesticus</i>)	
5.	Аллерген из пыльцы свинорога пальчатого (<i>Cynodon dactylon</i>)	
6.	Аллерген из пыльцы полевицы белой (<i>Agrostis alba</i>)	
7.	Аллерген из пыльцы мятлика лугового (<i>Poa pratensis</i>)	
8.	Аллерген из пыльцы плевела многолетнего (<i>Lolium perenne</i>)	
9.	Аллерген из пыльцы ежи сборной (<i>Dactylis glomerata</i>)	
10.	Аллерген из пыльцы тимopheевки луговой (<i>Phleum pratense</i>)	
11.	Аллерген из пыльцы овсяницы луговой (<i>Festuca elatior</i>)	
12.	Аллерген из пыльцы колоска душистого (<i>Anthoxanthum odoratum</i>)	
13.	Аллерген из пыльцы амброзии полыннолистной (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>)	Радиальная иммунодиффузия (Amb a 1)
14.	Аллерген из яда шершня желтого (<i>Vespa</i> spp.)	Определение фосфолипазы А и гиалоронидазы
15.	Аллерген из яда осы-полисты (<i>Polistes</i> spp.)	
16.	Аллерген из яда пчелы (<i>Apis mellifera</i>)	
17.	Аллерген из яда белолицего шершня (<i>Vespa</i> spp.)	
18.	Аллерген из яда шершня желтого жакета (<i>Vespula</i> spp.)	
19.	Микст-аллерген из яда шершней и ос (<i>Vespa</i> и <i>Vespula</i>)	

Современные требования, предъявляемые к препаратам аллергенов в Евросоюзе, изложены в Руководстве Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) [26] и в Европейской фармакопее (ЕФ) 9.0 [27].

В руководстве EMA содержатся рекомендации, касающиеся аттестации стандартных образцов, выбора методик, используемых для контроля качества, в том числе анализа постоянства характеристик препарата от серии к серии; критерии приготовления смеси сывороток, используемой для измерения активности [26]. Там же вводится понятие гомологичных групп аллергенов с целью экстраполяции данных, полученных при изучении свойств одного аллергена, на группу препаратов. К одной гомологичной группе относятся аллергены, которые соответствуют следующим критериям:

1. сопоставимые физико-химические и биологические свойства исходного материала;
2. перекрестная реактивность/структурная гомология аллергенов;
3. идентичная лекарственная форма готового препарата;

4. идентичный процесс производства экстракта аллергена и готового препарата.

В дальнейшем из группы выбирается один репрезентативный аллерген. Результаты исследований по качеству, безопасности и эффективности могут частично экстраполироваться с репрезентативного аллергена на остальные аллергены той же гомологичной группы. Исследования по безопасности необходимо проводить только для репрезентативного аллергена, для других аллергенов, входящих в одну гомологичную группу, требуются постмаркетинговые отчеты. Экстраполяция данных клинических исследований рассматривается согласно специальному руководству Рабочей группы по эффективности [28]. Перечень и состав гомологичных групп представлен в Приложении 1 руководства EMA по препаратам аллергенов [26].

В Евросоюзе, в отличие от США, каждая фирма-производитель создает собственные внутренние стандартные образцы аллергенов (in house reference standard, IHRS), которым присваивает собственные единицы измерения активности, и только в странах Северной Европы действует своя система стандартизации [29], которая предусматривает единые требования к биологической стандартизации.

Таблица 3. Единицы измерения биологической активности аллергенов, используемых европейскими фирмами с применением тестов *in vivo*

Фирма-изготовитель	Единицы аллергенной активности	Тест <i>in vivo</i>
«Севафарма», Чехия	JSK (jednotek standardních kvality — единицы стандартного качества)	Прик-тест (20 пациентов)
«Сталлержен», Франция	IR (index of reactivity) — индекс реактивности	Прик-тест с тремя серийными разведениями, контроль — 9 % кодеина фосфат (30 пациентов) 100 IR соответствует дозе аллергена, вызывавшего развитие кожной реакции диаметром 7 мм
«Аллербио», Франция	IR (index of reactivity) — индекс реактивности	Прик-тест с тремя серийными разведениями, контроль — 9 % кодеина фосфат
Страны северной Европы	BU (biological units) — биологические единицы	Накожные пробы (30 пациентов) 100 BU соответствует дозе аллергена, вызывавшего развитие кожной реакции диаметром 70 мм
«Лофарма С.п. А.», Италия	AU (allergen units) — аллергенные единицы	Назальные пробы
«Hall Allergy», Голландия	– AU (allergen units) — аллергенные единицы; – BAU — (bioequivalent allergy units) — биоэквивалентные биологические единицы	Внутрикожные пробы (15 сенситизированных пациентов)
«АЛК-Абелло А/С», Дания	– BU; – SQ-U (standardised quality units) — стандартизированная единица качества; – STU (standard treatment units) — стандартные лечебные единицы; – HEP (histamine equivalent prick/potency) — гистамин-эквивалентная активность	Накожные пробы (30 пациентов), контроль — раствор гистамина в концентрации 10 мг/мл HEP соответствует дозе аллергена, вызывающей развитие кожной реакции, эквивалентной реакции на раствор гистамина в концентрации 10 мг/мл
«Аллергофарима», Германия	SBU (standard biological units) — стандартные биологические единицы	Прик-тест, контроль — раствор гистамина в концентрации 0,1 %
«Leti», Италия	HEP _L (histamine-equivalent prick/potency (Leti)) — гистамин-эквивалентная активность («Лети»);	Двойной прик-тест (20 пациентов), контроль — раствор гистамина в концентрации 10 мг/мл
«Allergy Therapeutics», Великобритания	– DU/TU (diagnostic/therapeutic units) — диагностические/терапевтические единицы; – SU (standard units) — стандартные единицы	Прик-тест (15 пациентов)
«IPI-ASAC», Испания	UBE (unidades biológicas equivalentes — единицы биологических эквивалентов)	Двойной прик-тест с тремя серийными разведениями (30 пациентов), контроль — раствор гистамина в концентрации 0,1 мг/мл

Активность первой серии стандартного образца оценивают разными тестами *in vivo* (в основном кожные пробы), последующих — тестами *in vitro* (иммуноанализ).

В таблице 3 показано разнообразие единиц активности аллергенов, используемых в Европе [30].

В ЕФ [27] сформулированы требования, которым должны соответствовать стандартные образцы и коммерческие препараты.

Стандартный препарат необходимо охарактеризовать по содержанию белка (спектрофотометрия), профилю белка (изоэлектрическое фокусирование, электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофорез), иммуноэлектрофорез, капиллярный электрофорез, хроматография или масс-спектрометрия), аллергенным компонентам (главным и второстепенным аллергенам), например, методом иммуноблоттинга. Во всех возможных случаях устанавливают количественное содержание отдельных аллергенных компонентов.

Коммерческие препараты должны пройти испытания на подлинность (идентификацию) путем сравнения белкового и аллергенного профиля препарата с профилем стандартного образца одним из перечисленных выше методов, применяемых для IHRS. Должна быть определена общая аллергенная активность относительно IHRS методами *in vitro*, основанными на ингибировании связывающей способности аллергенспецифических IgE-антител. Также следует оценить содержание индивидуальных аллергенов (аллергенных компонентов) [27]. Необходимо отметить, что в Европе в настоящее время исследования направлены на то, чтобы понять, можно ли количественную оценку главных аллергенов в препаратах использовать в качестве метода оценки аллергенной активности

[26, 31–36]. Сведения об отдельных аллергенах представлены на сайте [37].

В таблице 4 указаны зарегистрированные в Российской Федерации препараты аллергенов, производимые и стандартизированные на территории Евросоюза по вышеуказанным процедурам.

В Российской Федерации выпускается 68 препаратов аллергенов (пыльцевых, бытовых, эпидермальных, пищевых), которые производятся на двух предприятиях — ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России (предприятие «АЛЛЕРГЕН» г. Ставрополь) и АО «Биомед» им. И. И. Мечникова (Московская обл.). Все препараты стандартизованы в единицах белкового азота (Protein nitrogen unit, PNU), специфическая активность каждой серии оценивается в кожных тестах (скарификация, прик-тест) [13].

В 1980–1990 гг. в ГИСК им. Л. А. Тарасевича были проведены работы по биологической стандартизации отечественных препаратов аллергенов и разработана методика *in vivo* (прик-тест) оценки биологической активности аллергенов. Были созданы отраслевые стандартные образцы (ОСО) пыльцевых, эпидермальных и грибковых аллергенов [38]. Каждая ампула ОСО содержала 100000 биологических единиц активности, которые соответствовали дозе аллергена в PNU, вызывающей образование волдыря со средним диаметром 7,94 мм. В методах *in vitro* вышеуказанные ОСО не были использованы.

В настоящее время в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, являющемся правопреемником ГИСК им Л. А. Тарасевича, продолжается работа по созданию стандартных образцов для оценки биологической активности препаратов аллергенов. В рамках выполнения государственного задания по теме научного исследования «Совершенство-

Таблица 4. Препараты аллергенов, выпускаемые в Евросоюзе и зарегистрированные в Российской Федерации

Производитель, страна	Перечень препаратов
«Севафарма», а.о., Чехия	1. Н-АЛ лечебный «Весенняя смесь ранняя» (Капли для приема внутрь); 2. Д-АЛ прик-тест диагностический «Весенняя смесь ранняя» (Раствор для проведения прик-теста); 3. Н-АЛ лечебный «Смесь клещей» (Капли для приема внутрь); 4. Д-АЛ прик-тест диагностический «Смесь клещей» (Раствор для проведения прик-теста); 5. Н-АЛ лечебный «Осенняя смесь пыльцевая» (Капли для приема внутрь); 6. Д-АЛ прик-тест диагностический «Осенняя смесь пыльцевая» (Раствор для проведения прик-теста); 7. Н-АЛ лечебный «Смесь трав I» (Капли для приема внутрь); 8. Д-АЛ прик-тест диагностический «Смесь трав I» (Раствор для проведения прик-теста); 9. Н-АЛ лечебный «Смесь плесеней наружных» (Капли для приема внутрь); 10. Д-АЛ прик-тест диагностический «Смесь плесеней наружных» (Раствор для проведения прик-теста); 11. Н-АЛ лечебный «Смесь плесеней домашних» (Капли для приема внутрь); 12. Д-АЛ прик-тест диагностический «Смесь плесеней домашних» (Раствор для проведения прик-теста)
АО «Сталлержен», Франция	1. Фосталь «Аллерген пыльцы деревьев» (Суспензия для подкожного введения); 2. Сталораль «Аллерген клещей» (Капли подязычные); 3. Сталораль «Аллерген пыльцы березы» (Капли подязычные); 4. Алюсталь «Аллерген клещей» (Суспензия для подкожного введения); 5. Алюсталь «Аллерген луговых трав» (Суспензия для подкожного введения); 6. Оралеир (Таблетки подязычные)
«Лофарма С.п. А.», Италия	1. Лайс Грасс (Таблетки для рассасывания); 2. Лайс Дерматофагоидес (Таблетки для рассасывания)
«АЛК-Абелло А/С», Дания	1. Гразакс (Таблетки-лиофилизат) 2. Рагвизакс (Таблетки-лиофилизат)

Таблица 5. Современные требования к стандартизации аллергенов

США	Европа*	Российская Федерация
Биологическая стандартизация относительно стандарта FDA, охарактеризованного по методу внутрикожных разведений ID ₅₀ EAL	Биологическая стандартизация относительно стандарта фирмы (in house reference standard, IHRS), охарактеризованного частными методиками <i>in vivo</i> (внутрикожные, накожные, назальные пробы)	Стандартизация в PNU относительно стандартного образца белкового азота [42] или Биологическая стандартизация относительно стандартного образца, охарактеризованного <i>in vivo</i> (кожные пробы/прик-тест)
Общая аллергенная активность <i>in vitro</i> . Оценка отдельных аллергенных компонентов в препаратах необязательна	Общая аллергенная активность <i>in vitro</i> . Оценка отдельных аллергенных компонентов в препаратах рекомендована	Специфическая активность методом кожных проб или аллергенная активность <i>in vitro</i> . Оценка общих аллергенных компонентов в препаратах рекомендована [43]

* ЕС и страны Северной Европы.

вание системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств» авторами статьи ведется разработка стандартного образца аллергена из пыльцы амброзии и стандартного образца специфической сыворотки к аллергену из пыльцы амброзии, а также стандартного образца специфической сыворотки, содержащей IgE-антитела к аллергену из пыльцы амброзии в лиофилизированной форме [39, 40].

В 2015 г. в Государственную фармакопею Российской Федерации, изд. XIII (ГФ РФ XIII) впервые введена общая фармакопейная статья «Аллергены» (ОФС.1.7.1.0001.15), в которой изложены рекомендации по биологической стандартизации аллергенов, соответствующие приведенным в монографии ЕФ [41].

В таблице 5 представлены основные требования по стандартизации аллергенов, предъявляемые в США, Европе и России.

Выводы

На сегодняшний день в стандартизации аллергенов существует несколько подходов — в США внедряется система национальных стандартных образцов, биологическая активность которых определена одной методикой, в Европе каждая фирма-производитель создает собственные внутренние стандарты (IHRS), охарактеризованные разными методами, но с обязательной оценкой главных аллергенов.

Все препараты, выпускаемые в Российской Федерации, стандартизированы в единицах белкового азота, принципы биологической стандартизации аллергенов приведены в ГФ РФ XIII.

Литература

- Chruszcz M, Pomés A, Glesner J, Vailes LD, Osinski T, Porebski PJ, et al. Molecular determinants for antibody binding on group 1 house dust mite allergens. *J Biol Chem*. 2012; 287(10): 7388–98.
- Thomas K, Bannon G, Herouet-Guicheney C, Ladics G, Lee L, Lee SI, et al. The utility of an international sera bank for use in evaluating the potential human allergenicity of novel proteins. *Toxicol Sci*. 2007; 97(1): 27–31.
- Sundin B, Lilja G, Graff-Lonnevig V, Hedlin G, Heilborn H, Norrind K, et al. Immunotherapy with partially purified and standardized animal dander extracts. I. Clinical results from a double-blind study on patients with animal dander asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1986; 77(3): 478–87.
- Van Metre TE Jr, Marsh DG, Adkinson NF Jr, Kagey-Sobotka A, Khattignavong A, Norman PS Jr, Rosenberg GL. Immunotherapy for cat asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1988; 82(6): 1055–68.
- Hedlin G, Graff-Lonnevig V, Heilborn H, Lilja G, Norrind K, Pegelow K, et al. Immunotherapy with cat- and dog-dander extracts. V. Effects of 3 years of treatment. *J Allergy Clin Immunol*. 1991; 87(5): 955–64.
- Hedlin G, Heilborn H, Lilja G, Norrind K, Pegelow KO, Schou C, Löwenstein H. Long-term follow-up of patients treated with a three-year course of cat or dog immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1995; 96(6 Pt 1): 879–85.
- Wahn U, Schweter C, Lind P, Löwenstein H. Prospective study on immunologic changes induced by two different Dermatophagoides pteronyssinus extracts prepared from whole mite culture and mite bodies. *J Allergy Clin Immunol*. 1988; 82(3 Pt 1): 360–70.
- Haugaard L, Dahl R, Jacobsen L. A controlled dose-response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite: clinical efficacy and side effects. *J Allergy Clin Immunol*. 1993; 91(3): 709–22.
- Creticos PS, Reed CE, Norman PS, Khoury J, Adkinson NF Jr, Buncher CR, et al. Ragweed immunotherapy in adult asthma. *N Engl J Med*. 1996; 334(8): 501–6.
- Osterballe O. Immunotherapy in hay fever with two major allergens 19, 25 and partially purified extract of timothy grass pollen. A controlled double blind study. In vivo variables, season I. *Allergy* 1980; 35(6): 473–89.
- Varney VA, Gaga M, Frew AJ, Aber VR, Kay AB, Durham SR. Usefulness of immunotherapy in patients with severe summer hay fever uncontrolled by antiallergic drugs. *BMJ* 1991; 302(6771): 265–9.
- Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W, et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med*. 1999; 341(7): 468–75.
- Фрадкин ВА. Диагностические и лечебные аллергены. М.: Медицина; 1990.
- Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, Alvarez-Cuesta E, Canonica GW, Chapman MD, et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1998; 81(5): 401–5.
- Chapman MD, Ferreira F, Villalba M, Cromwell O, Bryan D, Becker WM, et al. The European Union CREATE project: a model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 122(5): 882–889.e2.
- Filep S, Tsay A, Vailes L, Gadermaier G, Ferreira F, Matsui E, et al. A multi-allergen standard for the calibration of immunoassays: CREATE principles applied to eight purified allergens. *Allergy* 2012; 67(2): 235–41.
- CRS catalogue. Available from: <https://crs.edqm.eu>.
- Esch RE, Plunkett GA. Immunotherapy preparation guidelines, rules, and regulation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013; 13(4): 406–13.
- Yunginger JW. Allergens: recent advances. *Pediatr Clin North Am*. 1988; 35(5): 981–93.
- Harden VA. A short history of the National Institutes of Health. Available from: <http://history.nih.gov/exhibits/history/index.html>.

21. Milestones in U. S. food and drug law history. U. S. Food and Drug Administration. Available from: <http://www.fda.gov/opacom/backgrounders/miles.html>.
22. Methods of the allergenic products testing laboratory. Bethesda. CBER (Docket No 94N-0012) Federal Register, 1994. Available from: <https://goo.gl/nUmQcN>.
23. Turkeltaub PC. Biological standardization of allergenic extracts. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1989; 17(2): 53–65.
24. Turkeltaub PC, Rastogi SC, Baer H, Anderson MC, Norman PS. A standardized quantitative skin-test assay of allergen potency and stability: studies on the allergen dose-response curve and effect of wheal, erythema, and patient selection on assay results. *J Allergy Clin Immunol*. 1982; 70(5): 343–52.
25. Guidance for Industry On the Content and Format of Chemistry, Manufacturing and Controls Information and Establishment Description Information for an Allergenic Extract or Allergen Patch Test. Available from: <https://goo.gl/epkiy9>.
26. Guideline on allergen products: Allergen products production and quality issues. Committee for medicinal products for human use (CHMP). (EMA/CHMP/BWP/304831/2007) European Medicines Agency. London, 2008. Available from: <https://goo.gl/ZrKMyV>.
27. Allergen products. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
28. Guideline on the clinical development of products for specific immunotherapy for the treatment of allergic diseases. Committee for medicinal products for human use (CHMP) (CHMP/EWP/18504/2006). Available from: <https://goo.gl/zWZEtJ>.
29. Nordic Council on Medicines. Registration of Allergen Preparations: Nordic Guidelines, Volume 23. 1989.
30. Larenas-Linnemann D, Cox LS. European allergen extract units and potency: review of available information. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008; 100(2): 137–45.
31. Major allergens strongly underrepresented in some immunotherapy against bee stings. Available from: <https://goo.gl/ym1WMn>.
32. Fernández-Caldas E, Zakzuk J, Lockett RF. Allergen Standardization and Characterization (September, 2009). Available from: <https://goo.gl/9ggyXg>.
33. Becker WM, Vogel L, Vieths S. Standardization of allergen extracts for immunotherapy: where do we stand? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006; 6(6): 470–5.
34. Palomares O, Cramer R, Rhyner C. The contribution of biotechnology toward progress in diagnosis, management, and treatment of allergic diseases. *Allergy* 2014; 69(12): 1588–601.
35. Van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O, et al. The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy* 2008; 63(3): 310–26.
36. Takai T, Okamoto Y, Okubo K, Nagata M, Sakaguchi M, Fukutomi Y, et al. Japanese Society of Allergology task force report on standardization of house dust mite allergen vaccines — secondary publication. *Allergol Int*. 2015; 64(2): 181–6.
37. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. Available from: <http://www.allergen.org/index.php>.
38. Реестр отраслевых стандартных образцов состава и свойств медицинских иммунобиологических препаратов. Министерство здравоохранения СССР. Выпуск 1. М., 1988. С. 80.
39. Борисевич ИВ, Петухов ВГ, Волкова РА, Устинникова ОБ, Фадейкина ОВ, Малкова ВИ. Стандартные образцы как средство метрологического обеспечения аналитических методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2010; (4): 8–10.
40. Климов ВИ, Саканян ЕИ, Волкова РА, Фадейкина ОВ, Мовсесянц АА, Лебединская ЕВ, Шестакова АП. Анализ потребностей в стандартных образцах, предназначенных для оценки качества биологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2017; 17(2): 87–94.
41. ОФС. 1.7.1.0001.15. Аллергены. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. М.; 2015. С. 454–64. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
42. Волкова РА, Каргина ТМ, Гавриленкова ВЮ. Разработка стандартных образцов для анализа химических и физических показателей качества. Материалы VII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. М.; 1997. Т. 1. С. 426–7.
43. ОФС. 1.7.2.0034.15. Определение подлинности аллергенов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. М.; 2015. С. 852–61. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.

Об авторах

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

Невская Лариса Валерьевна. Главный эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Лавренчик Елена Ивановна. Ведущий эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Жданова Мария Юрьевна. Эксперт 1 категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Фадейкина Ольга Васильевна. Главный технолог Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Капитанова Вера Константиновна. Эксперт 2 категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Адрес для переписки: Невская Лариса Валерьевна; Nevskaya@exrmed.ru

International practice of allergen products standardization

L. V. Nevskaya, E. I. Lavrenchik, M. Yu. Zhdanova, O. V. Fadeykina, V. K. Kapitanova

Federal State Budgetary Institution

«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»

of the Ministry of Health of the Russian Federation,

Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

The article demonstrates that safe and efficacious use of allergen products for detection and treatment of allergic diseases relies on standardization and quality control methods. The article summarises various approaches to allergen products standardization that are used in the United States, the European Union and the Russian Federation. Development of requirements for allergen products of natural origin must take account of the heterogeneity of raw materials used in their production, since native allergen extracts are complex protein-polysaccharide mixtures consisting of allergenic (primary

and secondary) and non-allergenic components. Standardization of methods used for evaluation of allergen products potency is performed using reference standards. To date, there exist several approaches to allergens standardization. The United States introduced a system of national reference standards whose biological activity is determined by one technique (IntraDermal Dilution for 50 mm sum of Erythema determines bioequivalent Allergy Units — ID₅₀EAL). In Europe each manufacturer establishes their own in-house reference standards (IHRS) and assigns them with units of activity. Products manufactured in the Russian Federation are standardized in protein nitrogen units (PNU).

Key words: allergens; allergen products; major allergens; standardization; standards; biological activity; units of activity.

For citation: Nevskaya LV, Lavrenchik EI, Zhdanova MYu, Fadeyikina OV, Kapitanova VK. International practice of allergen products standardization. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(4): 222–229.

References

- Chruszcz M, Pomés A, Glesner J, Vailes LD, Osinski T, Porebski PJ, et al. Molecular determinants for antibody binding on group 1 house dust mite allergens. *J Biol Chem*. 2012; 287(10): 7388–98.
- Thomas K, Bannon G, Herouet-Guicheney C, Ladics G, Lee L, Lee SI, et al. The utility of an international sera bank for use in evaluating the potential human allergenicity of novel proteins. *Toxicol Sci*. 2007; 97(1): 27–31.
- Sundin B, Lilja G, Graff-Lonnevig V, Hedlin G, Heilborn H, Norrind K, et al. Immunotherapy with partially purified and standardized animal dander extracts. I. Clinical results from a double-blind study on patients with animal dander asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1986; 77(3): 478–87.
- Van Metre TE Jr, Marsh DG, Adkinson NF Jr, Kagey-Sobotka A, Khattignavong A, Norman PS Jr, Rosenberg GL. Immunotherapy for cat asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1988; 82(6): 1055–68.
- Hedlin G, Graff-Lonnevig V, Heilborn H, Lilja G, Norrind K, Pegelow K, et al. Immunotherapy with cat- and dog-dander extracts. V. Effects of 3 years of treatment. *J Allergy Clin Immunol*. 1991; 87(5): 955–64.
- Hedlin G, Heilborn H, Lilja G, Norrind K, Pegelow KO, Schou C, Löwenstein H. Long-term follow-up of patients treated with a three-year course of cat or dog immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1995; 96(6 Pt 1): 879–85.
- Wahn U, Schweter C, Lind P, Löwenstein H. Prospective study on immunologic changes induced by two different Dermatophagoides pteronyssinus extracts prepared from whole mite culture and mite bodies. *J Allergy Clin Immunol*. 1988; 82(3 Pt 1): 360–70.
- Haugaard L, Dahl R, Jacobsen L. A controlled dose-response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite: clinical efficacy and side effects. *J Allergy Clin Immunol*. 1993; 91(3): 709–22.
- Creticos PS, Reed CE, Norman PS, Khoury J, Adkinson NF Jr, Buncher CR, et al. Ragweed immunotherapy in adult asthma. *N Engl J Med*. 1996; 334(8): 501–6.
- Osterballe O. Immunotherapy in hay fever with two major allergens 19, 25 and partially purified extract of timothy grass pollen. A controlled double blind study. In vivo variables, season I. *Allergy* 1980; 35(6): 473–89.
- Varney VA, Gaga M, Frew AJ, Aber VR, Kay AB, Durham SR. Usefulness of immunotherapy in patients with severe summer hay fever uncontrolled by antiallergic drugs. *BMJ* 1991; 302(6771): 265–9.
- Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W, et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med*. 1999; 341(7): 468–75.
- Fradkin VA. Diagnostic and therapeutic allergens. Moscow: Meditsina; 1990 (in Russian).
- Bousquet J, Lockett R, Mallin HJ, Alvarez-Cuesta E, Canonica GW, Chapman MD, et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1998; 81(5): 401–5.
- Chapman MD, Ferreira F, Villalba M, Cromwell O, Bryan D, Becker WM, et al. The European Union CREATE project: a model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 122(5): 882–889.e2.
- Filep S, Tsay A, Vailes L, Gadermaier G, Ferreira F, Matsui E, et al. A multi-allergen standard for the calibration of immunoassays: CREATE principles applied to eight purified allergens. *Allergy* 2012; 67(2): 235–41.
- CRS catalogue. Available from: <https://crs.edqm.eu>.
- Esch RE, Plunkett GA. Immunotherapy preparation guidelines, rules, and regulation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013; 13(4): 406–13.
- Yunginger JW. Allergens: recent advances. *Pediatr Clin North Am*. 1988; 35(5): 981–93.
- Harden VA. A short history of the National Institutes of Health. Available from: <http://history.nih.gov/exhibits/history/index.html>.
- Milestones in U. S. food and drug law history. U. S. Food and Drug Administration. Available from: <http://www.fda.gov/opacom/backgrounders/miles.html>.
- Methods of the allergenic products testing laboratory. Bethesda. CBER (Docket No 94N-0012) Federal Register, 1994. Available from: <https://goo.gl/nUmQcN>.
- Turkeltaub PC. Biological standardization of allergenic extracts. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1989; 17(2): 53–65.
- Turkeltaub PC, Rastogi SC, Baer H, Anderson MC, Norman PS. A standardized quantitative skin-test assay of allergen potency and stability: studies on the allergen dose-response curve and effect of wheal, erythema, and patient selection on assay results. *J Allergy Clin Immunol*. 1982; 70(5): 343–52.
- Guidance for Industry On the Content and Format of Chemistry, Manufacturing and Controls Information and Establishment Description Information for an Allergenic Extract or Allergen Patch Test. Available from: <https://goo.gl/epkiy9>.
- Guideline on allergen products: Allergen products production and quality issues. Committee for medicinal products for human use (CHMP). (EMA/CHMP/BWP/304831/2007) European Medicines Agency. London, 2008. Available from: <https://goo.gl/ZrKMyV>.
- Allergen products. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
- Guideline on the clinical development of products for specific immunotherapy for the treatment of allergic diseases. Committee for medicinal products for human use (CHMP) (CHMP/EWP/18504/2006). Available from: <https://goo.gl/zWZEtJ>.
- Nordic Council on Medicines. Registration of Allergen Preparations: Nordic Guidelines, Volume 23. 1989.
- Larenas-Linnemann D, Cox LS. European allergen extract units and potency: review of available information. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008; 100(2): 137–45.
- Major allergens strongly underrepresented in some immunotherapy against bee stings. Available from: <https://goo.gl/ym1WMn>.
- Fernández-Caldas E, Zakzuk J, Lockett RF. Allergen Standardization and Characterization (September, 2009). Available from: <https://goo.gl/9ggyXg>.
- Becker WM, Vogel L, Vieths S. Standardization of allergen extracts for immunotherapy: where do we stand? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006; 6(6): 470–5.
- Palomares O, Cramer R, Rhyner C. The contribution of biotechnology toward progress in diagnosis, management, and treatment of allergic diseases. *Allergy* 2014; 69(12): 1588–601.
- Van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O, et al. The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy* 2008; 63(3): 310–26.
- Takai T, Okamoto Y, Okubo K, Nagata M, Sakaguchi M, Fukutomi Y, et al. Japanese Society of Allergology task force report on standardization of house dust mite allergen vaccines — secondary publication. *Allergol Int*. 2015; 64(2): 181–6.
- Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. Available from: <http://www.allergen.org/index.php>.
- Register branch standard samples of composition and properties of medical immunobiological preparations. The Ministry of health of the USSR. Issue 1. Moscow, 1988. P. 80 (in Russian).
- Borisevich IV, Petukhov VG, Volkova RA, Ustinikova OB, Fadeikina OV, Malkova VI. Standard samples as a tool to provide metrology of analytical methods of immunobiological medicines (IM) monitoring. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2010; 4(40): 8–10 (in Russian).

40. Klimov VI, Sakanyan EI, Volkova RA, Fadeykina OV, Movsesyants AA, Lebedinskaya EV, Shestakova AP. Analysis of the demand for reference standards used in quality evaluation of biologicals. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(2): 87–94 (in Russian).
41. OFS. 1.7.1.0001.15. Allergens. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th ed. V. 2. P. 454–64. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
42. Volkova RA, Kargina TM, Gavrilenkova VY. Development of standard samples for analysis of chemical and physical quality indicators. *Proceedings of the VII Congress of the all-Russian society of epidemiologists, microbiologists and Parasitologists*. Moscow; 1997. V. 1. P. 426–427 (in Russian).
43. OFS. 1.7.2.0034.15. Allergen identification. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th ed. V. 2. P. 852–61. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Nevskaya LV. Chief expert of the Immunology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Lavrenchik EI. Leading expert of Division for Expert Evaluation of Allergenes, Cytokines and other Immunomodulators of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Zhdanova MYu. 1st professional category expert of the Immunology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Fadeykina OV. Chief technologist of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Kapitanova VK. 2nd professional category expert of the Immunology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Contact e-mail: Nevskaya Larisa Valeryevna; Nevskaya@expmed.ru

Анализ стабильности показателей качества биологических лекарственных препаратов при проведении испытаний в рамках подтверждения соответствия

Д. С. Давыдов

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

Поступила 07.06.2017 г. Принята к публикации 26.10.2017 г.

Статистический анализ закономерностей количественных данных, получаемых в результате лабораторной экспертизы, является одним из важнейших элементов обеспечения качества. В равной степени анализ трендов необходим при подтверждении соответствия биологических лекарственных препаратов требованиям нормативной документации и для обеспечения достоверности лабораторных испытаний. В статье кратко рассмотрены позиции Всемирной организации здравоохранения и Международной организации по стандартизации по вопросам анализа трендов при выпуске биологических препаратов, в частности, вакцин, а также методическим подходам к планированию и организации процедуры выборочного контроля.

Ключевые слова: управление качеством; биологические лекарственные препараты; вакцины; подтверждение соответствия; контрольные карты.

Библиографическое описание: Давыдов Д.С. Анализ стабильности показателей качества биологических лекарственных препаратов при проведении испытаний в рамках подтверждения соответствия. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(4); 230–232.

Биологические лекарственные препараты (БЛП) — лекарственные препараты, действующее вещество которых произведено или выделено из биологического источника и для определения свойств и качества которых необходима комбинация биологических и физико-химических методов. К БЛП относятся иммунобиологические лекарственные препараты, лекарственные препараты, полученные из крови, плазмы крови человека и животных (за исключением цельной крови), биотехнологические лекарственные препараты, генотерапевтические лекарственные препараты [1].

Обеспечение надлежащего качества БЛП является одним из важных элементов биологической безопасности и санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации [2, 3]. БЛП, вне зависимости от наличия международного непатентованного названия (МНН) и принадлежности к группе анатомо-терапевтически-химической классификации [4], подлежат подтверждению соответствия; форма подтверждения соответствия зарегистрированных и выпускаемых в оборот БЛП определена постановлением Правительства Российской Федерации от 1 декабря 2009 г. № 982 [5]. Обязательной сертификации подлежат иммунобиологические лекарственные препараты, в том числе применяемые в медицине вакцины, анатоксины, токсины, сыворотки, иммуноглобулины, препараты крови, препараты, полученные методом генной инженерии из других биологических субстратов. Ряд наименований БЛП подлежит подтверждению соответствия в форме принятия декларации о соответствии, при наличии у изготовителя (продавца) протокола исследований (испытаний) и измерений, проведенных в аккредитованной в установленном порядке испытательной лаборатории (центре), или сертификата системы качества, выданного органом по сертификации, аккредитованным в

установленном порядке, или действительного сертификата соответствия на продукцию, выданного органом по сертификации, аккредитованным в установленном порядке.

Согласно Рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (далее — Рекомендации ВОЗ) [6], к организации, уполномоченной на принятие решения о соответствии БЛП каждой партии БЛП, в частности, вакцин, предъявляются требования по наличию документированных процедур, определяющих порядок подтверждения соответствия (часть 3, пункт LR01.01; часть 4, пункт PV15 Рекомендаций ВОЗ). Данная организация, при условии подтверждения ее компетентности в установленном порядке и наличии необходимых документированных процедур, имеет право устанавливать показатели качества и частоту лабораторных испытаний, на основании которых проводится выпуск каждой серии вакцин (часть 3, пункт LR01.06; часть 4, пункт PV15.06; см. также часть 3, пункт LR04.04; часть 4, пункт PV18.04 Рекомендаций ВОЗ); также за организацией закреплено право выпуска серий на основании результатов анализа сводного протокола производства и контроля (часть 3, пункт LR01.03; часть 4, пункт PV15.03 Рекомендаций ВОЗ).

Совокупность методических подходов к планированию и организации процедуры выборочного контроля сформулирована в серии технических документов Международной организации по стандартизации (ISO) серии 2859, которым соответствуют государственные стандарты Российской Федерации серии ГОСТ Р 50779, в том числе:

- ISO 28590. Процедуры выборочного контроля по альтернативному признаку. Часть 0. Введение в систему выборочного контроля по альтернативному признаку [7].
- ISO 2859-1:1999. Планы выборочного контроля последовательных партий на основе приемлемого уровня качества (AQL) [8].

- ISO 2859-2:1985. Планы выборочного контроля отдельных партий на основе предельного качества (LQ) [9].
- ISO 2859-3:2005. Часть 3. Планы выборочного контроля с пропуском партий [10].
- ISO 2859-4:2002. Часть 4. Оценка соответствия заявленному уровню качества [11].
- ISO 8422:2006. Последовательные планы выборочного контроля по альтернативному признаку [12].

Одним из базовых принципов организации контроля продукции является возможность использования схем нормального, ослабленного и усиленного контроля, которые предназначены для скоординированного использования на последовательной серии партий с переключением между различными уровнями выборочного контроля в зависимости от предыдущих результатов контроля.

Одним из обязательных элементов системы управления качеством в организации является наличие документированных процедур анализа данных о размере серий/партий, результатах тестов, эффективности стандартных образцов и средств контроля и т.д., которые используются для выявления изменений и анализа трендов информации [13]. Уже на начальном этапе внедрения таких процедур чрезвычайно эффективными инструментами могут быть так называемые «7 старых инструментов контроля качества Каору Ишикава» — например, двухпараметрические распределения Парето и контрольные карты, в том числе контрольные карты индивидуальных значений, контрольные карты средних значений и размахов, контрольные карты средних значений и квадратичных отклонений [14, 15].

Необходимо отметить, что актуальность внедрения и постоянного использования этих процедур критически велика при проведении выборочного контроля и при подтверждении соответствия БЛП одного торгового наименования при выпуске различных серий более чем в одной аккредитованной лаборатории/испытательном центре.

В соответствии с предписаниями ВОЗ, испытательная лаборатория должна непрерывно контролировать и анализировать лабораторные результаты; крайне важно соблюдать качество, индивидуальное для каждого препарата и производителя, и определять тенденции (тренды) несоответствия или изменения результатов относительно верхнего или указанного нижнего предела достоверности. Анализ должен вестись непрерывно, в режиме реального времени. Необходимы документированные процедуры проведения корректирующих и предупреждающих действий в случае отклонений, в том числе порядок взаимодействия с производителями вакцин (часть 4, пункт LA09 Рекомендаций ВОЗ).

Также требуется проведение систематического анализа тенденций данных для всех или определенных наборов процедур испытаний, для результатов испытаний и для определенных продуктов и производителей [6] (часть 4, пункт LA09.04 Рекомендаций ВОЗ).

Кроме того, необходимо выполнение систематического анализа тенденций для данных по оценке использования эталонных материалов и стандартов [6] (часть 4,

пункт LA09.05 Рекомендаций ВОЗ). Обязательно систематическое проведение сравнения результатов, полученных в ходе лабораторных испытаний в лаборатории с результатами, полученными из лабораторий контроля качества различных продуктов и различных производителей. В случае отклонений и тенденций к изменению данных, следует оценить причину, при необходимости совместно с лабораторией контроля качества производителя (часть 4, пункт LA09.06 Рекомендаций ВОЗ).

Литература

1. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
2. Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу (утв. Президентом Российской Федерации 1 ноября 2013 г. № Пр-2573).
3. Миронов АН, Сунотницкий МВ. Современное состояние экспертизы иммунобиологических лекарственных препаратов в Российской Федерации. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2012; (1): 4–7.
4. ATC/DDD Index 2017. Available from: https://www.whocc.no/atc_ddd_index.
5. Постановление Правительства Российской Федерации от 1 декабря 2009 г. № 982 «Об утверждении единого перечня продукции, подлежащей обязательной сертификации, и единого перечня продукции, подтверждение соответствия которой осуществляется в форме принятия декларации о соответствии».
6. WHO harmonized National Regulatory Authority assessment tool (rev. 2014). World Health Organization, 2014. Available from: <https://goo.gl/siLMTf>.
7. ISO 28590:2017. Sampling procedures for inspection by attributes — Introduction to the ISO 2859 series of standards for sampling for inspection by attributes. Available from: <https://www.iso.org/standard/64622.html>.
8. ISO 2859-1:1999. Sampling procedures for inspection by attributes — Part 1: Sampling schemes indexed by acceptance quality limit (AQL) for lot-by-lot inspection. Available from: <https://www.iso.org/standard/1141.html>.
9. ISO 2859-2:1985. Sampling procedures for inspection by attributes — Part 2: Sampling plans indexed by limiting quality (LQ) for isolated lot inspection. Available from: <https://www.iso.org/standard/7867.html>.
10. ISO 2859-3:2005. Sampling procedures for inspection by attributes — Part 3: Skip-lot sampling procedures. Available from: <https://www.iso.org/standard/34684.html>.
11. ISO 2859-4:2002. Sampling procedures for inspection by attributes — Part 4: Procedures for assessment of declared quality levels. Available from: <https://www.iso.org/standard/36164.html>.
12. ISO 28591:2017. Sequential sampling plans for inspection by attributes. Available from: <https://www.iso.org/ru/standard/64623.html>.
13. Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities. World Health Organization, 2010. Available from: <https://goo.gl/XCTw1o>.
14. ISO 7870-1:2014. Control charts — Part 1: General guidelines. Available from: <https://www.iso.org/standard/62649.html>.
15. Алексеева ИА, Чуприна РП, Давыдов ДС. Оценка стабильности технологического процесса с помощью контрольных карт на примере анализа информации об иммуногенной активности коклюшного компонента АКДС-вакцины. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2009; (6): 70–5.

Об авторе

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

Давыдов Дмитрий Сергеевич. Начальник лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Давыдов Дмитрий Сергеевич; Davydov@expmed.ru

Trend analysis of batch to batch consistency during quality assessment of biological medicinal products

D. S. Davydov

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

The statistical analysis of trends in the quantitative data obtained during laboratory evaluation is one of the most important conditions of ensuring quality. Equally, the analysis of trends is necessary to confirm the compliance of biological medicinal products to the requirements of manufacturers' quality standards and to ensure the reliability of laboratory tests. The article briefly surveys the positions of the World Health Organization (WHO) and the International Organization for Standardization (ISO) on the analysis of trends in the production of biological medicinal products, especially vaccines, as well as on methodological approaches to the planning and organization of random sampling checks.

Key words: quality management; biological medicinal products; vaccines; conformity assessment; control charts.

For citation: Davydov DS. Trend analysis of batch to batch consistency during quality assessment of biological medicinal products. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(4): 230–232.

References

1. Federal Law of April 12, 2010 № 61-FZ «On Medicine Circulation» (in Russian).
2. Bases of state policy in the field of ensuring chemical and biological safety of the Russian Federation until 2025 and further prospect (approved by the President of the Russian Federation on November 1, 2013 № Pr-2573) (in Russian).
3. Mironov AN, Supotnitskiy MV. Current state of immunobiological medicines expert evaluation in the Russian Federation. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2012; (1): 4–7 (in Russian).
4. ATC/DDD Index 2017. Available from: https://www.whocc.no/atc_ddd_index.
5. Decree of the Government of the Russian Federation of December 1, 2009 № 982 «About the approval of the uniform list of production, the subject obligatory certification, and the uniform list of production which confirmation of compliance is carried out in the form of adoption of the declaration on compliance» (in Russian).
6. WHO harmonized National Regulatory Authority assessment tool (rev. 2014). World Health Organization, 2014. Available from: <https://goo.gl/siLMTf>.
7. ISO 28590:2017. Sampling procedures for inspection by attributes — Introduction to the ISO 2859 series of standards for sampling for inspection by attributes. Available from: <https://www.iso.org/standard/64622.html>.
8. ISO 2859-1:1999. Sampling procedures for inspection by attributes — Part 1: Sampling schemes indexed by acceptance quality limit (AQL) for lot-by-lot inspection. Available from: <https://www.iso.org/standard/1141.html>.
9. ISO 2859-2:1985. Sampling procedures for inspection by attributes — Part 2: Sampling plans indexed by limiting quality (LQ) for isolated lot inspection. Available from: <https://www.iso.org/standard/7867.html>.
10. ISO 2859-3:2005. Sampling procedures for inspection by attributes — Part 3: Skip-lot sampling procedures. Available from: <https://www.iso.org/standard/34684.html>.
11. ISO 2859-4:2002. Sampling procedures for inspection by attributes — Part 4: Procedures for assessment of declared quality levels. Available from: <https://www.iso.org/standard/36164.html>.
12. ISO 28591:2017. Sequential sampling plans for inspection by attributes. Available from: <https://www.iso.org/ru/standard/64623.html>.
13. Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities. World Health Organization, 2010. Available from: <https://goo.gl/XCTw1o>.
14. ISO 7870-1:2014. Control charts — Part 1: General guidelines. Available from: <https://www.iso.org/standard/62649.html>.
15. Alekseeva IA, Chuprinina RP, Davydov DS. Assessment of consistency of technological process using control cards on the example of analysis of information on immunogenic activity of pertussis component of DTP vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2009; (6) 70–5 (in Russian).

Author

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation
Davydov DS. Head of the Laboratory of Bacteriophages and Normal Flora Preparations with the Collection of Microorganisms of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Contact e-mail: Davydov Dmitrii Sergeevich; Davydov@expmed.ru

Экстракт цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве адъюванта при интраназальной иммунизации мышей гриппозными антигенами

А. С. Гудымо, С. В. Мальцев, В. А. Евсеенко, Н. В. Данильченко, В. Ю. Марченко,
А. Г. Дурыманов, А. Б. Рыжиков

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

Поступила 10.08.2017 г. Принята к публикации 26.10.2017 г.

В статье описано первое использование сока и экстракта клубней цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве адъюванта при интраназальной иммунизации мышей гриппозными антигенами. Для иммунизации использовали концентрацию антигенов 300 мкг/мл каждого субтипа. Адъювант добавлялся в концентрации 10 и 20 мг/мл. Сыворотки крови изучали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и иммуноферментном анализе (ИФА). После двух иммунизаций дозой 7,5 мкг максимальные обратные титры к H1/H3/В-компонентам в РТГА составили 320/80/80 соответственно. Введение интраназального препарата сравнения без адъюванта не привело к сероконверсии, детектируемой в РТГА. В сыворотках крови мышей, иммунизированных интраназально препаратом сравнения без адъюванта, не отмечено достоверного нарастания уровня антител между первым и вторым введением. В группах, иммунизированных интраназально препаратом, содержащим 10 мг/мл (0,5 мг в 1 дозе, объемом 50 мкл) адъюванта, отмечено значимое нарастание уровня антител между однократной и двукратной иммунизацией для всех компонентов, детектированных в ИФА, а средние уровни антител сопоставимы с ответом, полученным на однократное внутримышечное введение дозы препарата, содержащей 5 мкг каждого антигена. Несмотря на разброс значений титров сывороток крови между животными, который мы связываем с невозможностью стандартного внесения 50 мкл препарата в носоглотку мыши, применение экстракта в качестве адъюванта при интраназальной иммунизации мышей высококонцентрированными гриппозными антигенами показало выраженный гуморальный ответ. Уровень этого ответа после двукратной иммунизации у некоторых животных сравним с ответом на гриппозные вакцины при внутримышечном введении. Полученные данные позволяют рассматривать сок и экстракт клубней цикламена европейского или его синтетические аналоги для дальнейших исследований на морских свинках, хорьках или других животных-моделях с целью разработки эффективного адъюванта для интраназальной вакцинации.

Ключевые слова: экстракт; цикламен; вакцина; адъювант; интраназальный; иммунизация; грипп; респираторный; инфекция.

Библиографическое описание: Гудымо АС, Мальцев СВ, Евсеенко ВА, Данильченко НВ, Марченко ВЮ, Дурыманов АГ, Рыжиков АБ. Экстракт цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве адъюванта при интраназальной иммунизации мышей гриппозными антигенами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2017; 17(4): 233–239.

Вирус гриппа ежегодно привлекает внимание медицинского сообщества и общественности, вызывая локальные вспышки и эпидемии. Помимо гибели людей, тяжелых осложнений и другого ущерба здоровью, заболевание вызывает нетрудоспособность значительного числа людей, а как следствие — экономические потери. В настоящий момент для вакцинации используются как живые, так и инактивированные вакцины. К живым вакцинам относят Flumist («MedImmune», США), широко применяемую в США, Канаде и Ультравак («Микроген», Россия), доля которой невелика. В основе этих вакцин лежит реассортант холодоадаптированного варианта вируса гриппа и актуальных штаммов вируса гриппа А(H3N2), А(H1N1)pdm09 и В. В настоящий момент доступна и четырехвалентная версия Flumist («MedImmune», США), содержащая помимо антигенов А(H3N2), А(H1N1)pdm09, антигены вирусов двух основных групп (линий) гриппа В — Yamagata и Victoria.

Инактивированных вакцин значительно больше. Они представлены несколькими вариантами, различающимися

ся по степени подготовки антигена (цельновирионные, расщепленные, субъединичные), наличию адъюванта и субстрата, на котором культивируются антигены (развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ), культуры клеток). Также в некоторых странах доступны четырехвалентные инактивированные варианты вакцин.

Из-за малых объемов производства применение вакцин от гриппа изначально предполагало защиту людей из групп риска. С появлением технологий массового производства, вакцинация от гриппа стала способом формирования протективной иммунной прослойки, препятствующей эпидемическому процессу, и средством управления заболеваемостью в масштабах государства. В некоторых благополучных странах избежать эпидемий, гибели людей и значительного экономического ущерба не удастся, несмотря на охват населения прививками против гриппа в соответствии с рекомендациями Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ).

Исследования, проводившиеся в США, показали следующие ориентировочные данные по эффективности

гриппозных вакцин. Для возрастной группы 18–64 лет эффективность инaktivированных тривалентных вакцин варьировала от 16 до 75 %. Для детей возраста 6–24 месяцев — от 7 до 66 %. Применение живых вакцин показало следующие результаты. Для группы возраста 6 месяцев–7 лет — от 57 до 93 %, 18–49 лет — от 8 до 48 %, для взрослых старше 60 лет — в среднем 42 %. Существенный разброс определяется степенью соответствия вакцинных штаммов патогенным циркулирующим вирусам в различные периоды исследований и методикам проведения исследований [1]. По данным, полученным в Нидерландах, с учетом диагностически подтвержденных случаев заболевания гриппом было установлено, что усредненная эффективность современных гриппозных вакцин составляет около 40 % в случае полного соответствия вакцин эпидемическим вирусам и 20 %, если хотя бы один компонент тривалентной вакцины серологически не идентичен [2]. Учитывая повсеместное применение вакцин на основе антигенов, произведенных на РКЭ, и формирующих гуморальный ответ, имеющий низкую нейтрализующую активность в отношении циркулирующих вариантов, требуется по-новому рассмотреть перспективы использования препаратов, полученных на клеточных культурах, а также различные способы доставки антигена [3, 4].

В начале 2000-х годов компанией «Berna Biotech» (Берн, Швейцария) на европейский рынок была выведена инaktivированная интраназальная вирусомальная противогриппозная вакцина NasalFlu. Эта вакцина была получена путем включения гемагглютинина и нейраминидазы в мембраны липосом, состоящих из фосфатидилхолина и интраназального адъюванта на основе термолабильного токсина *Escherichia coli* (Heat-labile toxin, HLT). Двукратное интраназальное введение адъювантной-HLT вирусомальной вакцины гриппа индуцировало гуморальный иммунный ответ, который сравним с таковым при однократной парентеральной вакцинации. Высокая индукция специфического для вируса гриппа иммуноглобулина А была отмечена в слюне после двух назальных применений. Это показало, что использование HLT в качестве адъюванта для слизистой оболочки необходимо для получения гуморального иммунного ответа, сравнимого с парентеральной вакцинацией [5, 6]. Все серии показали хорошую переносимость и соответствовали необходимым критериям, предъявляемым к гриппозным вакцинам, прошли клинические исследования на взрослых и детях и были разрешены к применению в Швейцарии. В 2000–2001 гг. в Швейцарии было зафиксировано 46 случаев паралича Белла. Несмотря на то, что нормальная встречаемость заболевания составляет от 15 до 40 случаев на 100000 населения, зафиксированные случаи некоторые исследователи связали с применением вакцины NasalFlu [7]. Публикация этих данных в научной литературе и средствах массовой информации привела к исчезновению вакцины NasalFlu и ее производителя — компании «Berna Biotech» (Берн, Швейцария). В тоже время была показана высокая перспективность данного подхода в случае использования безопасных интраназальных адъювантов.

Перспективной группой иммуностимулирующих адъювантов являются тритерпеноидные гликозиды или сапонины, полученные из растительных источников. Характерной особенностью сапонинов является способность к гемолизу. Гидрофобная часть молекулы сапониона интегрируется в клеточную мембрану. Стерическая интерференция этих комплексов вызывает кривизну мембраны, ведущую к образованию пор в мембране. Эти процессы несут

дозозависимый эффект. Для стандартизации медицинских препаратов на основе сапонинов используют гемолитический индекс. Сапонины широко используются в качестве адъювантов в течение многих лет и включены в несколько ветеринарных вакцин. Было показано, что QS21, высокоочищенная фракция из Quil A (*Quillaja saponaria*), является адъювантом для Th1 цитокинов (IL-2 и IFN- γ) и антител изотипа IgG2a, что указывает на Th1-ответ у мышей [8, 9].

Исследовалась возможность использования наноэмульсий гриппозных антигенов для интраназальной вакцинации. Полученные результаты заложены в основу перспективных интраназальных вакцин от гриппа, респираторно-синцитиального вируса, вируса простого герпеса, разрабатываемых компаниями «NanoBio» (США) [10]. Также подтверждают целесообразность этого направления данные об адъювантных свойствах маннатида (Mannatide, гетерополисахарид, выделенный из гемолитического штамма *Streptococcus*) при интраназальной иммунизации мышей гриппозными антигенами [11]. Особый интерес к интраназальному введению инaktivированных гриппозных антигенов вызван формированием кросс-протективного иммунитета в отношении различных субтипов вирусов гриппа [12].

При выборе потенциальных субстанций на роль интраназального адъюванта учитывались следующие факторы: препарат должен быть зарегистрирован как лекарственное средство, подтвердившее свою безопасность и свободно обращающееся в аптечной сети; иметь очевидный механизм взаимодействия с эпителием. Сок и экстракт клубней цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) содержат тритерпеноидные гликозиды, которые определяют его гемолитические свойства, и широко применяются для лечения синуситов.

Цель исследования — оценка сероконверсии после однократного и двукратного интраназального введения экспериментального препарата, содержащего антигены вируса гриппа, сок и экстракт клубней цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве иммуностимулирующего адъюванта.

Для достижения цели работы предполагалось решить следующие задачи: подготовить экспериментальные и контрольные препараты; провести интраназальную иммунизацию мышей экспериментальными и контрольными препаратами, внутримышечную иммунизацию мышей разными дозами антигена, не содержащими адъювант, согласно схеме иммунизации; получить сыворотки крови мышей, провести их анализ методами РТГА, ИФА и оценить уровень сероконверсии.

Материалы и методы

Подготовка препаратов

Дозировку антигена для внутримышечной иммунизации мышей выбирали с целью квалификации антигена, использовавшегося при изготовлении интраназального препарата, и подтверждения его иммуногенных свойств.

Дозировка антигена в интраназальном препарате была обусловлена следующими факторами. Целесообразно использовать то количество антигена, которое входит в применяющиеся инaktivированные гриппозные вакцины, вводимые парентерально. За ориентир были взяты вакцины, содержащиеся в дозе 15 мкг каждого антигена. Исходя из данных о необходимости двукратного интраназального

введения препарата для достижения значимой сероверсии, приведенных в работе R. Gluck [6], была выбрана доза 7,5 мкг каждого антигена.

Концентрация адъюванта была выбрана в соответствии с инструкцией к лекарственному препарату, использовавшемуся как источник сока и экстракта клубней цикламена, рекомендованному для лечения синуситов у детей старше 5 лет и взрослых, т.е. 10 мг/мл (0,5 мг/доза). Для оценки потенциального усиления эффекта была выбрана доза 20 мг/мл (1 мг/доза).

Перед вакцинацией мышей препарат коммерчески доступной трехвалентной инактивированной расщепленной гриппозной вакцины, содержащий антигены штаммов, подобных A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), B/Phuket/3073/2013, натрия хлорид, калия хлорид, натрия гидрофосфата дигидрат, калия дигидрофосфат и воду, сконцентрировали в 10 раз (до итоговой концентрации гемагглютиниона каждого субтипа 300 мкг/мл) при помощи центрифужных мембранных концентраторов с диаметром пор 100 кДа («Millipore», США) в соответствии с инструкцией производителя. Используемая коммерчески доступная вакцина являлась стерильной. Концентрацию антигенов подтверждали в реакции одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД) с использованием стандартов антигенов и сывороток, полученных из Национального института биологических стандартов и контроля, Соединенное Королевство (NIBSC, UK) [13]. Лиофилизат сока и экстракта клубней цикламена европейского свежих 50 мг («FARMA MEDITERRANIA», S. L., Испания) разводили водой для инъекций в объеме 500 мкл. Стерильность адъюванта не проверяли. Адъювант хранили до использования при температуре 4 °С. Активность препарата подтверждали в гемолитической реакции. Реакцию проводили в микропланшетах. Титровали по схеме 50 мкл воды для инъекций + 50 мкл препарата. Во все лунки добавляли 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов петуха в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,4. Контроль неспецифического лизиса проводили в 4 лунках, содержащих 50 мкл воды, 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов петуха в ФСБ, pH 7,4. Через 45 мин фиксировали

разведение, при котором наблюдался полный лизис эритроцитов, и разведение, в котором лизиса не наблюдалось. Гемолитическую реакцию использовали для подтверждения стабильности хранения адъюванта между иммунизациями. В данной реакции индекс использовавшегося адъюванта составил 1:512–1:1024 после регидратации препарата и сохранялся в течение 2 недель. Сведение компонентов проводили непосредственно перед иммунизацией в стерильных условиях.

Иммунизация мышей

Работы проводили в соответствии с «Политикой Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии (ФБун ГНЦ ВБ) «Вектор» Роспотребнадзора в области работы с лабораторными животными». Самок аутбредных мышей ICR весом 16–18 г получали из вивария ФБун ГНЦ ВБ «Вектор». До начала иммунизации экспериментальные животные находились на адаптационном карантине и стандартном рационе вивария *ad libitum*. Эксперименты включали 10 групп по 4 мыши в каждой (табл. 1).

Внутримышечное введение осуществляли с соблюдением стерильности. Интраназальное введение проводили без предварительной подготовки животных. Наркотизацию животных при внутримышечной и интраназальной вакцинации не проводили.

Иммунизацию трех групп мышей осуществляли путем внутримышечного введения 50 мкл препаратов, содержащих 15, 5 и 1 мкг каждого антигена вируса гриппа соответственно, в бедренную мышцу обеих задних конечностей в объеме 25 мкл на инъекцию (суммарно 50 мкл). Для введения малого объема препарата и четкой дозировки использовали 1-мл шприц с дополнительно надеваемым на поршень пластиковым ограничителем, который не позволял ввести больше забранной из пробирки дозы (25 мкл). Дозу 25 мкл предварительно вносили в пробирку объемом 0,2 мл автоматической пипеткой, откуда 1-мл шприцем, содержащим около 150 мкл препарата без воздушных пузырей, полностью отбирали. Проводили интраназальную иммунизацию 6 групп препаратом, содержа-

Таблица 1. Результаты анализа сывороток крови в РТГА

№ группы	Препарат	Доза антигена, мкг	Способ иммунизации	Кратность иммунизации	СГТ (H1)	СГТ (H3)	СГТ (B)
1	Антиген	15	Внутримышечно	1	57 (20–80)	5	12 (5–20)
2	Антиген	5	Внутримышечно	1	20 (10–80)	5	6 (5–10)
3	Антиген	1	Внутримышечно	1	14 (10–20)	5	5
4	Антиген	7,5	Интраназально	1	5	5	5
5	Антиген	7,5	Интраназально	2	5	5	5
6	Антиген + Адъювант 10 мг/мл (0,5 мг/доза)	7,5	Интраназально	1	10 (5–80)	5	5
7	Антиген + Адъювант 10 мг/мл (0,5 мг/доза)	7,5	Интраназально	2	40 (5–320)	20 (5–80)	64 (20–80)
8	Антиген + Адъювант 20 мг/мл (1 мг/доза)	7,5	Интраназально	1	16,8 (5–80)	5	5
9	Антиген + Адъювант 20 мг/мл (1 мг/доза)	7,5	Интраназально	2	160	5	80
10	Адъювант 10 мг/мл (0,5 мг/доза)	0	Интраназально	2	5	5	5

Примечание. Приведены средние геометрические значений обратных титров (СГТ) и интервал значений. Значения в РТГА <10 в расчетах считали равными 5. Данные для группы 9 приведены для 1 животного.

щим 7,5 мкг антигена вируса гриппа и дополнительно экстракт цикламена в концентрации 10 мг/мл (0,5 мг/доза) и 20 мг/мл (1 мг/доза) (табл. 1). Дозу 50 мкл препарата с помощью автоматической пипетки наносили на носовую ход зафиксированной мыши, пока весь объем не проходил через носоглотку в рот животного. Точного дозирования не предполагалось. Повторную интраназальную иммунизацию проводили через 14 суток. Экспериментальным животным, составляющим группу сравнения отрицательного контроля, интраназально вводили 50 мкл раствора адьюванта с концентрацией 10 мг/мл (0,5 мг/доза).

Кровь у мышей, анестезированных зоветилом, брали из ретроорбитального синуса на 21-е сутки после начала иммунизации. Сыворотку от сгустка отделяли центрифугированием при 1500 об/мин (200g) в течение 10 мин. Сыворотку крови переносили в новые пробирки и хранили в низкотемпературном холодильнике при минус 20 °С.

Реакция торможения гемагглютинации

Полученную сыворотку крови перед постановкой РТГА в течение 18 ч обрабатывали препаратом нейраминидазы холерного вибриона (receptor destroying enzyme, RDE, производства «Denka Seiken», Япония) согласно инструкции производителя для удаления неспецифических термостабильных ингибиторов, затем прогревали на водяной бане при 56 °С для удаления неспецифических термолabile ингибиторов и инактивации ферментативной активности RDE. Сыворотки крови исследовали в РТГА против 4 гемагглютинирующих единиц антигена вируса соответствующего серотипа. Для определения титра сывороток крови серотипов H1N1 в РТГА использовали 0,5 % суспензию эритроцитов петуха в ФСБ, pH 7,4 и 96-луночный планшет с V-образным дном (Greiner Bio-One GmbH, Германия); для антигена субтипа H3 использовали 1 % суспензию эритроцитов морской свинки [14]. При расчете средних геометрических титров (СГТ), значения в РТГА <1/10 считали равными 5. В качестве антигенов использовали инаktivированные бета-пропиолактоном вирусы гриппа штаммов A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), B/Phuket/3073/2013 (International Reagent Resource, США). Также в РТГА использовали комплиментарные этим штаммам хоряковые антисыворотки, предназначенные для контроля иммуногенности существующих гриппозных вакцин (International Reagent Resource, США).

Иммуноферментный анализ

Инаktivированный вирусный антиген (International Reagent Resource, США) разбавляли в 25 раз ФСБ, pH 7,4 (ООО «БиолоТ», Россия), раствор вносили в полистироловые планшеты (SPL Lifesciences, Республика Корея) по 50 мкл в лунку и оставляли на ночь при комнатной температуре до полного высыхания. Планшет с сорбированным антигеном промывали 3 раза ФСБ-Т (ФСБ с добавлением 0,05 % Твин-20). Сыворотки крови вносили в серийных двукратных разведениях, начиная с 1:100 по 100 мкл в лунку и инкубировали 1,5 ч при комнатной температуре. После отмывки от сыворотки планшет заполняли раствором антител козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена («Абсам», США) в разведении 1:20000 и инкубировали при комнатной температуре 40 мин. После очередной промывки заполняли лунки готовым к использованию раствором тетраметилбензидина и оставляли в темноте на 30 мин. Реакцию тормозили 5 % раствором серной кислоты и оптическую плотность

измеряли на планшетном фотометре (Multiscan EX, Thermo Scientific, США) при 450 нм. Титр сыворотки определяли как максимальное разведение, при котором оптическая плотность превышала фоновый сигнал конъюгата в 2 раза.

Статистическая обработка данных

Результаты экспериментов обрабатывали статистически с помощью программы Excel Microsoft. Для данных РТГА определяли среднее геометрическое значений обратных титров. Данные ИФА приведены в диаграмме средних геометрических значений обратных титров с доверительным интервалом (ДИ) (рис. 1). ДИ для средних геометрических был определен следующим образом. Полученные значения титров ИФА логарифмировали по основанию 2, после чего определяли среднее арифметическое значение логарифмов и ДИ₉₅ при $p = 0,95$ для них. Максимальное значение ДИ_{95max} рассчитывали путем добавления к среднему значению ДИ, а минимальное значение ДИ_{95min} — путем вычитания из среднего ДИ. После этого проводили потенцирование среднего арифметического значения максимальной и минимальной величины ДИ путем возведения в степень 2 значений среднего арифметического ДИ_{95max} и ДИ_{95min}.

Результаты и обсуждение

В ходе проведения эксперимента отмечалось патологическое влияние адьюванта при интраназальном применении на организм мыши. В частности, после иммунизации препаратом, содержащим адьювант в концентрации 20 мг/мл (1 мг/доза), через 1–3 ч наблюдалось беспокойное поведение мышей, чихание, покраснение носа, взъерошенная шерсть на голове. Отдельные животные этой группы переставали питаться и практически не двигались. Наблюдалось развитие отека головы, одышка. Гибель наступала в течение двух-трех суток после применения препарата. В то же время другие мыши этой группы проявляли только беспокойное поведение; чихания, покраснения носа, отека и гибели не происходило. Мы связываем это с возможным попаданием препарата в бронхи с последующим поражением и развитием отека легкого, затруднением дыхания, приводившего к гипоксии и гибели животного. При применении препарата, содержащего адьювант в концентрации 10 мг/мл (0,5 мг/доза), наблюдались те же признаки, но гибель животных не происходила. Из 8 мышей, иммунизированных данным препаратом, погибла только одна мышь.

Результаты РТГА представлены в таблице 1. Данные для группы 9 представлены титрами сыворотки одного животного и статистической обработке не подвергались. Одно животное этой группы погибло на 3-и сутки после первой вакцинации, 2 животных погибло после второй вакцинации на 2-е и 3-и сутки. Наиболее выраженный ответ отмечен для компонента A(H1N1)pdm09. Максимальный титр 1/320 определен в сыворотке крови животного после двукратной интраназальной иммунизации препаратом, содержащим 7,5 мкг каждого антигена и адьювант в концентрации 10 мг/мл (0,5 мг/доза). Наименьшим был ответ на A(H3N2) компонент, только в одной группе сыворотки тормозили гемагглютинацию, максимальный титр составил 1/80. Максимальный ответ на компонент В отмечен в группах 7 и 9, он составил 1/80. Анализ средних геометрических титров групп 4 и 5 показывает, что прироста сывороточных титров у животных, иммунизированных интраназально препаратом без адьюванта, между первой и

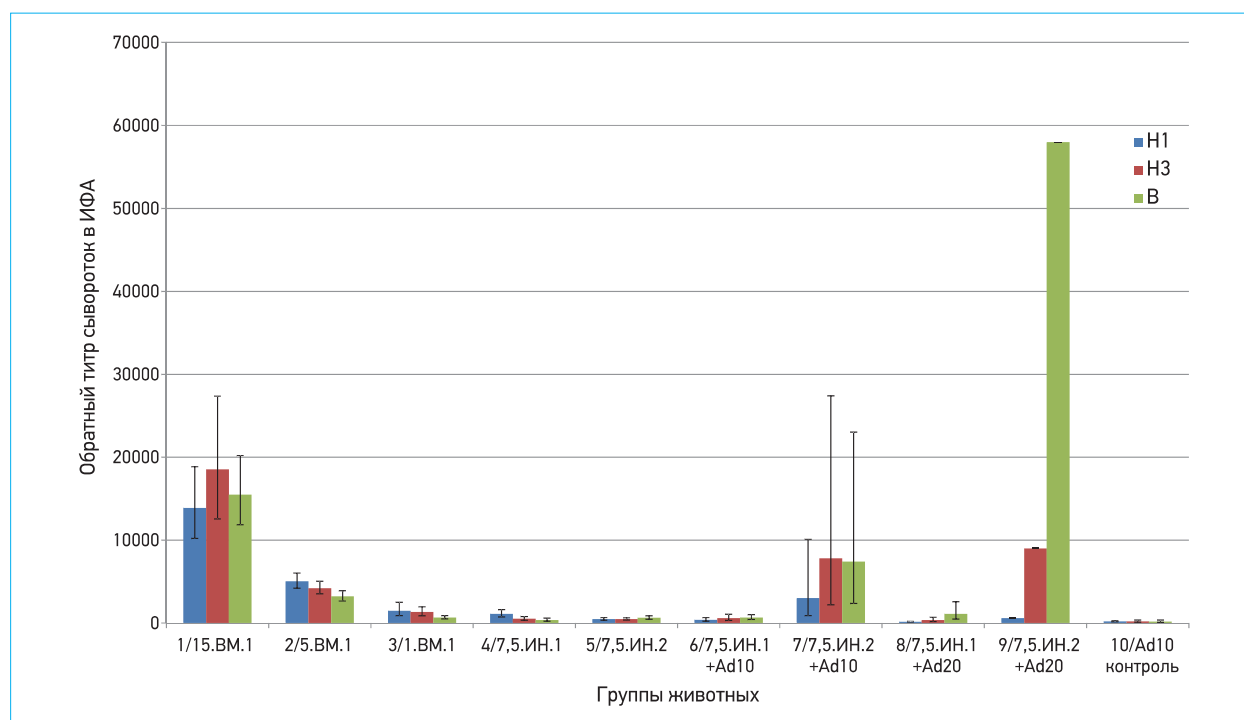


Рис. 1. Результаты анализа сывороток крови в ИФА. Группы маркированы как «номер группы/доза (мкг). путь введения (BM — внутримышечно, ИН — интраназально). кратность иммунизации (1 или 2) + адъювант в концентрации (10 мг/мл (0,5 мг/доза) или 20 мг/мл (1 мг/доза))».

второй вакцинацией в РТГА не наблюдалось или фиксировалось снижение значений. В группах 6, 7 и 8, 9 отмечен прирост для всех субтипов.

Результаты, полученные в ИФА, свидетельствуют о наличии дозозависимого эффекта для всех компонентов в группах 1, 2 и 3, в которых животные иммунизировались внутримышечно. В сыворотках крови мышей групп 4 и 5, иммунизированных интраназально препаратом сравнения без адъюванта, не отмечено достоверного нарастания уровня антител между первым и вторым введением. В группах 6 и 7, иммунизированных интраназально препаратом, содержащим 10 мг/мл (0,5 мг/доза) адъюванта, отмечено значимое нарастание уровня антител между однократной и двукратной иммунизацией для всех компонентов, а средние уровни антител сопоставимы с ответом, полученным на однократное внутримышечное введение препарата, содержащего 5 мкг каждого антигена (антитела детектировали в ИФА). Группы 8 и 9, иммунизированные препаратом, содержащим 20 мг/мл (1,0 мг/доза) адъюванта, анализу не поддаются из-за гибели 3 из 4 животных группы 9 в ходе эксперимента.

Полученные данные свидетельствуют о том, что предлагаемое применение интраназальной двукратной иммунизации позволяет получать гуморальный ответ у некоторых животных, сравнимый с ответом после внутримышечной иммунизации. Разброс значений, с нашей точки зрения, обусловлен индивидуальным иммунным статусом мышей линии ICR и качественным введением препарата в носоглотку мыши, не предполагавшим точной дозы введения. На мышинной модели невозможно обеспечить стандартное введение препарата интраназально в объеме 50 мкл. Меньший объем требовал концентрирования исходного коммерческого препарата более чем в 10 раз, что неизбежно приводило бы к агрегации и искажению вводимой дозы. Важным фактором, с нашей точки зрения,

обусловившим высокие титры сыворотки крови у некоторых животных, является высокая концентрация каждого антигена — 300 мкг/мл. Для дальнейшего анализа перспективности описанного подхода необходимо проведение исследований на более крупных животных, например, морских свинках или хорьках, которым возможно полноценное интраназальное введение спрея. Кроме того, необходимо исключить попадание препарата в бронхи и нижние дыхательные пути модельных животных. Продолжительное использование сока и экстракта клубней цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) при терапии синуситов у человека, подтвердившее безопасность его применения, позволяет нам сфокусироваться на иммуногенности и протективности разрабатываемых нами препаратов [15].

Выводы

Несмотря на существенный разброс значений титров сывороток крови животных, который мы связываем с невозможностью стандартного внесения 50 мкл препарата в носоглотку мыши, применение сока и экстракта клубней цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве адъюванта при интраназальной иммунизации мышей высококонцентрированными гриппозными антигенами показало выраженный гуморальный ответ. Уровень этого ответа после двукратной иммунизации у некоторых животных сравним с ответом на гриппозные вакцины при внутримышечном введении.

Учитывая гибель подавляющего числа экспериментальных животных после интраназального введения препарата, содержащего адъювант в концентрации 20 мг/мл (1 мг/доза), целесообразно в дальнейших исследованиях использовать препараты с адъювантом в концентрации 10 мг/мл (0,5 мг/доза). Для получения объективных дан-

ных по иммуногенности и безопасности препаратов, содержащих сок и экстракт клубней цикламена европейского, целесообразно использовать животных, имеющих схожее с человеческим строение носоглотки.

Полученные данные позволяют рассматривать сок и экстракт клубней цикламена европейского или его синтетические аналоги как адъювант для разработки интраназальных вакцин от острых респираторных вирусных заболеваний.

Литература

- Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12(1): 36–44.
- Darvishian M, Dijkstra F, van Doorn E, Bijlsma MJ, Donker GA, de Lange MM, et al. Influenza vaccine effectiveness in the Netherlands from 2003/2004 through 2013/2014: The importance of circulating influenza virus types and subtypes. *PLoS One* 2017; 12(1): e0169528.
- Raymond DD, Stewart SM, Lee J, Ferdman J, Bajic G, Do KT, et al. Influenza immunization elicits antibodies specific for an egg-adapted vaccine strain. *Nat Med*. 2016; 22(12): 1465–9.
- Lee J, Boutz DR, Chromikova V, Joyce MG, Vollmers C, Leung K, et al. Molecular-level analysis of the serum antibody repertoire in young adults before and after seasonal influenza vaccination. *Nat Med*. 2016; 22(12): 1456–64.
- Glück R. Intranasal immunization against influenza. *J Aerosol Med*. 2002; 15(2): 221–8.
- Glück U, Gebbers JO, Glück R. Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without *Escherichia coli* heat-labile toxin in adult volunteers. *J Virol*. 1999; 73(9): 7780–6.
- Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med*. 2004; 350(9): 896–903.
- Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 2011; 72(6): 435–57.
- Vajdy M, Srivastava I, Polo J, Donnelly J, O'Hagan D, Singh M. Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. *Immunol Cell Biol*. 2004; 82(6): 617–27.
- Hamouda T, Chepurinov A, Mank N, Knowlton J, Chepurnova T, Mys A, et al. Efficacy, immunogenicity and stability of a novel intranasal nanoemulsion-adjuvanted influenza vaccine in a murine model. *Hum Vaccin*. 2010; 6(7): 585–94.
- Ren ST, Zhang XM, Sun PF, Sun LJ, Guo X, Tian T, et al. Intranasal immunization using mannate as a novel adjuvant for an inactivated influenza vaccine and its adjuvant effect compared with MF59. *PLoS One* 2017; 12(1): e0169501.
- Quan FS, Compans RW, Kang SM. Oral vaccination with inactivated influenza vaccine induces cross-protective immunity. *Vaccine* 2012; 30(2): 180–8.
- Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. Методические указания. МУ 3.3.2.1758 – 03 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28.09.2003).
- WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. World Health Organization, 2004. Available from: <https://goo.gl/k1qjv7>.
- Синуформе®, «Фарма Медитеррания СЛ», Испания, ЛС-000026, Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. Available from: <https://goo.gl/97qYZo>.

Об авторах

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

Гудымо Андрей Сергеевич. Аспирант, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии отдела зоонозных инфекций и гриппа.

Мальцев Семён Владимирович. Научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии отдела зоонозных инфекций и гриппа.

Евсеенко Василий Александрович. Заведующий лабораторией зоонозных инфекций отдела зоонозных инфекций и гриппа, канд. биол. наук.

Данильченко Наталья Викторовна. Младший научный сотрудник лаборатории серологических методов анализа отдела зоонозных инфекций и гриппа.

Марченко Василий Юрьевич. Заведующий лабораторией гриппа отдела зоонозных инфекций и гриппа, канд. биол. наук.

Дурыманов Александр Гаврилович. Старший научный сотрудник лаборатории серодиагностики гриппа отдела зоонозных инфекций и гриппа.

Рыжиков Александр Борисович. Заведующий отделом зоонозных инфекций и гриппа, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Гудымо Андрей Сергеевич; gudyimo as@vector.nsc.ru

Cyclamen europaeum (*Cyclamen purpurascens*) extract as adjuvant for nasal immunization of mice with influenza antigens

A. S. Gudymo, S. V. Maltsev, V. A. Evseenko, N. V. Danilchenko, V. Y. Marchenko, A. G. Durymanov, A. B. Ryzhikov

Federal Budgetary Research Institution «State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo 630559, Novosibirsk region, Russian Federation

The article describes the first attempt to use the juice and extract of *Cyclamen europaeum* (*Cyclamen purpurascens*) tubers as an adjuvant for intranasal immunization of mice with influenza antigens. The concentration of antigens used for immunization was 300 µg/ml for each subtype. The adjuvant was added at the concentration of 10 and 20 mg/ml. Blood serum was studied using the hemagglutination inhibition reaction (HI) and enzyme immunoassay (ELISA). After two immunizations with a dose of 7.5 µg, the maximum inverse titers to the H1/H3/B components in the HI were 320/80/80, respectively. The administration of an intranasal comparator without an adjuvant did not result in seroconversion which can be detected by the HI. The analysis of the blood sera of mice, immunized intranasally by the antigen only, showed no increase in the an-

tibody levels between the first and second injections. For mice immunized intranasally by a preparation containing 10 mg/ml (0.5 mg per 50 µl dose) of adjuvant the ELISA detected a significant growth of antibody levels for all components, and GMT antibody levels were comparable to GMT antibody levels after a single intramuscular injection of 5 µg of each antigen. Despite a significant serum titer dispersion (which the authors explain by the impossibility of ensuring absolute uniformity in administration of 50 µl of substance via the nasal route) the use of the extract as an adjuvant for intranasal immunization of mice with highly concentrated influenza antigens showed a significant humoral response. The level of this response after two immunizations in some animals was comparable to that after intramuscular administration. The obtained data open the possibility of using *Cyclamen europaeum* tuber extract or its chemical analogues in further studies in guinea pigs, ferrets or other animal models in order to develop an efficacious adjuvant for intranasal immunization.

Key words: extract; cyclamen; vaccine; adjuvant; intranasal; immunization; influenza; respiratory; infection.

Bibliographic description: Gudymo AS, Maltsev SV, Evseenko VA, Danilchenko NV, Marchenko VY, Durymanov AG, Ryzhikov AB. *Cyclamen europaeum* (*Cyclamen purpurascens*) extract as adjuvant for nasal immunization of mice with influenza antigens. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(4): 233–239.

References

1. Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012; 12(1): 36–44.
2. Darvishian M, Dijkstra F, van Doorn E, Bijlsma MJ, Donker GA, de Lange MM, et al. Influenza vaccine effectiveness in the Netherlands from 2003/2004 through 2013/2014: The importance of circulating influenza virus types and subtypes. *PLoS One* 2017; 12(1): e0169528.
3. Raymond DD, Stewart SM, Lee J, Ferdman J, Bajic G, Do KT, et al. Influenza immunization elicits antibodies specific for an egg-adapted vaccine strain. *Nat Med.* 2016; 22(12): 1465–9.
4. Lee J, Boutz DR, Chromikova V, Joyce MG, Vollmers C, Leung K, et al. Molecular-level analysis of the serum antibody repertoire in young adults before and after seasonal influenza vaccination. *Nat Med.* 2016; 22(12): 1456–64.
5. Glück R. Intranasal immunization against influenza. *J Aerosol Med.* 2002; 15(2): 221–8.
6. Glück U, Gebbers JO, Glück R. Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without *Escherichia coli* heat-labile toxin in adult volunteers. *J Virol.* 1999; 73(9): 7780–6.
7. Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med.* 2004; 350(9): 896–903.
8. Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 2011; 72(6): 435–57.
9. Vajdy M, Srivastava I, Polo J, Donnelly J, O'Hagan D, Singh M. Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. *Immunol Cell Biol.* 2004; 82(6): 617–27.
10. Hamouda T, Chepurinov A, Mank N, Knowlton J, Chepurnova T, Myc A, et al. Efficacy, immunogenicity and stability of a novel intranasal nanoemulsion-adjuvanted influenza vaccine in a murine model. *Hum Vaccin.* 2010; 6(7): 585–94.
11. Ren ST, Zhang XM, Sun PF, Sun LJ, Guo X, Tian T, et al. Intranasal immunization using mannate as a novel adjuvant for an inactivated influenza vaccine and its adjuvant effect compared with MF59. *PLoS One* 2017; 12(1): e0169501.
12. Quan FS, Compans RW, Kang SM. Oral vaccination with inactivated influenza vaccine induces cross-protective immunity. *Vaccine* 2012; 30(2): 180–8.
13. Methods for quality control indicators of immunobiological medical drugs for influenza prophylaxis and diagnostics. Guidelines. MY 3.3.2.1758 – 03 (approved by Chief State Sanitary Physician of the Russian Federation) (in Russian).
14. World Health Organization (2004) WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Available from: <https://goo.gl/k1qjv7>.
15. Sinuforte®, Farma Mediterranea, S. L., Spain, LS-000026, Russian National register of medical drugs. Available from: <https://goo.gl/97qYzo> (in Russian).

Authors

Federal Budgetary Research Institution «State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo 630559, Novosibirsk region, Russian Federation.

Gudymo AS. PhD student, Junior Research Scientist of the Laboratory of Molecular and Cellular Immunology of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza.

Maltsev SV. Research Scientist of the Laboratory of Molecular and Cellular Immunology of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza.

Evseenko VA. Head of the Laboratory of Zoonotic Diseases of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza. Candidate of Biological Sciences.

Danilchenko NV. Junior Research Scientist of the Laboratory of Serological Test Methods of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza.

Marchenko VY. Head of the Laboratory of Influenza of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza. Candidate of Biological Sciences.

Durymanov AG. Senior Research Scientist of the Laboratory of Influenza Serodiagnostics of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza.

Ryzhikov AB. Head of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza. Candidate of Biological Sciences.

Contact e-mail: Gudymo Andrey Sergeevich; gudymo as@vector.nsc.ru

Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной живой

И. В. Касина, С. А. Алексеева, З. Е. Бердникова, Т. И. Немировская, А. С. Алехина

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

Поступила 05.10.2017 г. Принята к публикации 26.10.2017 г.

В статье представлены перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной живой (далее по тексту — вакцина туляремийная) по показателям «Подлинность», «Специфическая активность (количество живых микробных клеток)» и «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов». Изучена возможность совершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной по показателю «Подлинность» с помощью коммерческого диагностического набора реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии («ИХ тест-система *F. tularensis*»). Для оптимизации и усовершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной по показателю «Специфическая активность (количество живых микробных клеток)» в качестве дополнительной питательной среды для определения количества живых микробных клеток рекомендовано использовать готовую к применению питательную среду для культивирования и выделения туляремийного микроба. Предложено усовершенствовать методику проведения экспертизы качества вакцины туляремийной по показателю «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов» за счет исключения стадии пересева на тигмогликолевую среду на 5–7 сут, что экономически и практически целесообразно, а также снизит риск возможности получения ложноположительных результатов.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*; вакцина туляремийная живая; подлинность; специфическая активность; количество живых микробных клеток; питательная среда для культивирования и выделения туляремийного микроба (FT-агар), отраслевой стандартный образец.

Библиографическое описание: Касина ИВ, Алексеева СА, Бердникова ЗЕ, Немировская ТИ, Алехина АС. Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной живой. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(4): 240–247.

Экспертиза качества иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) содержит комплекс мер, включающий проведение измерений, анализ испытаний совокупности свойств и характеристик, а также их сравнение с установленными требованиями с целью определения соответствия полученных и требуемых величин параметров качества и является основной составляющей в системе менеджмента качества. Усовершенствование экспертизы качества ИЛП, в том числе за счет экономических и технологических показателей, также является неотъемлемой частью системы качества [1–4].

Экспертиза качества вакцины туляремийной живой (далее по тексту — вакцина туляремийная) проводится с целью подтверждения соответствия показателей качества требованиям нормативной документации (далее НД) [5].

Цель работы — оценка перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной по показателям: «Подлинность», «Специфическая активность (количество живых микробных клеток)» и «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов».

В задачи исследования входило проведение испытаний образцов вакцины туляремийной по показателям качества «Подлинность», «Специфическая активность (количество живых микробных клеток)», «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов» по предлагаемой нами усовершенствованной методике и анализ полученных результатов.

Материалы и методы

Проведены испытания отраслевого стандартного образца вакцины туляремийной живой (ОСО 42-28-398-2016) серии 7 иммунохроматографическим методом по показателю «Подлинность». В испытании применяли набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии («ИХ тест-система *F. tularensis*») серии 11 производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (г. Оболensk, Серпуховский р-н) по ТУ 9398-092-78095326-2008 (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05486) С помощью набора «ИХ тест-система *F. tularensis*» возможно выявление и идентификация возбудителя туляремии *Francisella tularensis* в микробных взвесьях с концентрацией 10^7 м.к./мл, полученных из колоний микроорганизмов или из объектов внешней среды путем специальной пробоподготовки. В соответствии с инструкцией по применению, готовят микробную взвесь туляремийного штамма, выращенного на плотной питательной среде, в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 (далее по тексту — РБФ: раствор буферный фосфатный). РБФ готовят *ex tempore*, стерилизация раствора не требуется. Так как туляремийная вакцина представляет собой лиофилизированную в стабилизирующей среде живую культуру вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, пробоподготовку для испытания осуществляли следующим образом: без предварительного

культивирования препарат разводили буферным раствором. Общую концентрацию микробных клеток в суспензии определяли в соответствии с разделом НД «Специфическая активность (концентрация микробных клеток)» по ОСО мутности бактериальных взвесей 42-28-85-2017 (10 МЕ), затем разводили до концентрации 10^9 м.к./мл. Пробы прогревали на водяной бане при 56°C в течение 30 мин, центрифугировали в течение 2 мин при 10000 об/мин, затем разводили с помощью РБФ до концентрации 10^8 и 10^7 м.к./мл. Пробы вакцины в концентрации 10^9 , 10^8 и 10^7 м.к./мл исследовали с помощью набора «ИХ тест-система *F. tularensis*».

В качестве препарата сравнения в соответствии с НД на вакцину туляреминовую, использовали набор реагентов иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляреминовые сухие производства филиала «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (серия 558).

Проведены испытания образцов четырех коммерческих серий (09, 010, 011 и 012) вакцины туляреминой бактериологическим методом по показателю «Специфическая активность (количество живых микробных клеток)». В испытании использовали питательную среду для культивирования и выделения туляреминого микроба, готовую к применению (серия 10), производства ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора (г. Оболensk) по ТУ 9398-116-78095326-2010 и зарегистрированную на территории Российской Федерации (регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10649).

Для сравнения применяли питательную среду для культивирования и выделения туляреминого микроба сухую (FT-агар), серии 21 производства ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора (г. Оболensk) по ТУ 9398-028-78095326-2007 (регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00899), рекомендованную НД на вакцину туляреминовую.

По усовершенствованной нами методике проведения испытания по показателю «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов» были испытаны стандартные образцы вакцины туляреминой. В качестве сравнения проводили испытания по методике, представленной в НД на вакцину туляреминовую.

Кроме того, был проведен анализ результатов испытаний образцов 25 серий вакцины туляреминой живой и 11 образцов вакцины чумной живой серии 1-17 по показателю «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов».

Все препараты были исследованы в течение срока годности.

Результаты и обсуждение

Одним из основных показателей качества является подлинность препарата. В соответствии с ГФ XIII ОФС.1.8.1.0002.15 «Иммунобиологические лекарственные препараты», подлинность может подтверждаться различными лабораторными методами (биологическими, иммунобиологическими, молекулярными, химическими и физико-химическими), позволяющими специфически идентифицировать лекарственный препарат [6]. В соответствии с требованиями НД, подлинность вакцины туляреминой определяется иммунофлуоресцентным методом с помощью коммерческого препарата — иммуноглобулинов диагностических туляреминовых флуоресцирующих или аналогичных, зарегистрированных на территории Российской

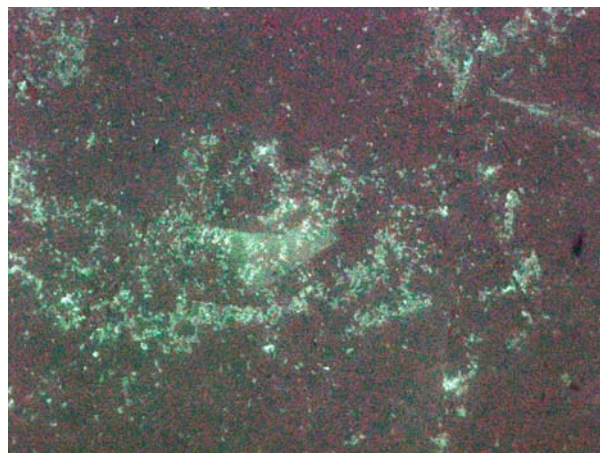


Рис. 1. Образец препарата вакцины туляреминой, окрашенный иммуноглобулинами диагностическими туляреминовыми флуоресцирующими в рабочем разведении 1:32. Увеличение $\times 1000$.

Федерации. Метод определения подлинности основан на окраске микробных клеток туляреминого микроба специфическими иммуноглобулинами, меченными флуоресцентным красителем. Учет результатов проводится по четырехкрестовой системе. Специфическое свечение оболочки микробной клетки на 4 креста — сверкающая, а на 3 креста — яркая флуоресценция желтовато-зеленого цвета, четко контрастируемая с темным телом микробной клетки. Специфическое свечение оболочки микробной клетки на 4 и 3 креста считается положительным результатом на подтверждение наличия туляреминого микроба. Диагностические иммуноглобулины специфичны и не выявляют гетерологичные микроорганизмы. Туляреминый микроб представляет собой грамотрицательные очень мелкие ($0,1-0,5$ мкм) неподвижные полиморфные кокковидные палочки. Как видно на фотографии, при увеличении в 1000 раз, микробные клетки светятся целыми конгломератами, что затрудняет учет результатов (рис. 1). Кроме того, основанием для поиска альтернативных методов испытания вакцины туляреминой по показателю «Подлинность» послужил и тот факт, что зарегистрированные на территории Российской Федерации иммуноглобулины диагностические туляреминовые флуоресцирующие выпускаются единственным предприятием — филиалом «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России.

С целью поиска альтернативных методов оценки подлинности вакцины, нами был проведен анализ диагностических препаратов, предназначенных для выявления туляреминого микроба, выпускаемых и зарегистрированных на территории Российской Федерации [7, 8]. Предпочтение имели препараты для ускоренной идентификации туляреминого микроба, осуществляемой в течение одного рабочего дня. Таким препаратом является «ИХ тест-система *F. tularensis*», предназначенная для экспресс-выявления и идентификации микробных клеток *F. tularensis* при проведении лабораторных исследований объектов окружающей среды. Тест-система представляет собой пластиковую диагностическую панель (фулляр) с лункой для внесения образца и с окошком для считывания результатов (рис. 2). Специфической мишенью, наличие которой в пробе выявляет данный тест, является липополисахарид *F. tularensis*. Были проведены испытания

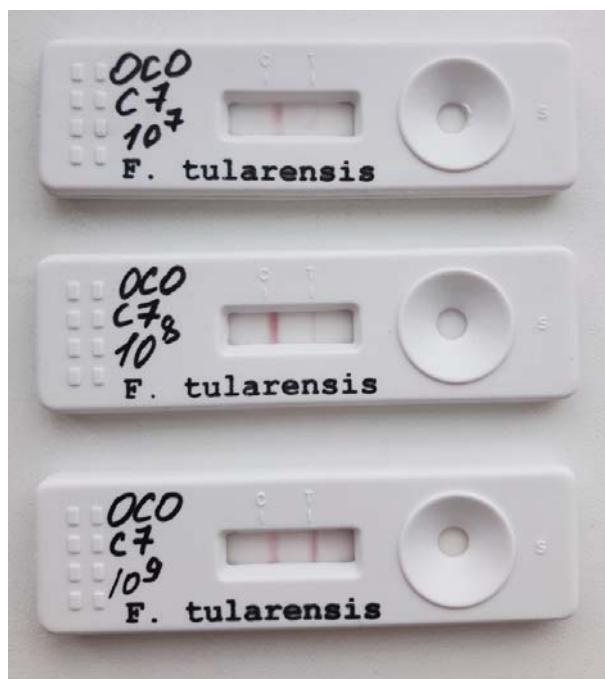


Рис. 2. Результаты подтверждения подлинности ОСО вакцины туляреминой с помощью набора реагентов для иммунохроматографического экспресс выявления и идентификации возбудителя туляремии («ИХ тест-системы *F. tularensis*»).

3 стандартных образцов вакцины туляреминой в концентрациях 10^9 , 10^8 и 10^7 м.к./мл. Для этого приготовленные (как описано в разд. «Материалы и методы») пробы вакцины в объеме 0,1 мл вносили на диагностическую панель. Через 15–20 мин учитывали результат. Положительным результатом на присутствие туляреминого микроба является наличие видимых глазом красных линий в зоне «С» и «Т», где зона «С» — контрольная полоса, а зона «Т» — опытная полоса. При этом интенсивность цвета полос не учитывается. Интенсивность полос в зоне «С» и «Т» может отличаться. Об отрицательном результате свидетельствует наличие красной линии только в зоне «С». Как видно на фотографии, в концентрации 10^7 м.к./мл в зоне «Т» тест-полоса практически не заметна, а в концентрациях 10^8 и 10^9 м.к./мл результаты явно положительные, четко видна тест-полоса (рис. 2). Таким образом, рекомендуемые нами концентрации вакцины для проведения испытания по показателю «Подлинность» составляют 10^8 и 10^9 м.к./мл.

Анализируя методику проведения испытаний в соответствии с НД и с использованием набора «ИХ тест-система *F. tularensis*» в отношении длительности пробоподготовки, собственно продолжительности исследования и учета результатов, можно сделать вывод, что в целом продолжительность проведения обоих испытаний одинакова. Приблизительное время, затрачиваемое на испытание, составляет в обоих случаях 2–2,5 ч. Однако результаты, полученные с помощью набора «ИХ тест-система *F. tularensis*», несомненно, информативнее.

Одним из основных показателей качества вакцины является «Специфическая активность», обусловленная общей концентрацией микробных клеток и количеством живых микробных клеток [1, 2, 5]. На основании результатов, полученных по данному показателю, определяется количество накожных и внутрикожных доз вакцины в ам-

пуле. Штаммы *F. tularensis* особо требовательны к условиям культивирования, они не растут на питательных средах широкого применения — мясо-пептонном агаре и бульоне, агаре и бульоне Хоттингера. Оптимальными условиями для их культивирования являются слабощелочные агаровые или желточные среды с добавлением цистеина, дефибринированной крови, тканевых экстрактов и других стимуляторов роста [9, 10, 11]. Питательная среда для культивирования и выделения туляреминого микроба (FT-агар), рекомендованная НД, является оптимальной питательной средой, обеспечивающей все необходимые условия для культивирования вакцинного штамма *F. tularensis*.

Нами было проведено испытание образцов четырех коммерческих серий вакцины туляреминой по показателю «Специфическая активность (количество живых микробных клеток)» с помощью питательной среды для культивирования и выделения туляреминого микроба, готовой к применению в сравнении с питательной средой для культивирования и выделения туляреминого микроба (FT-агар), согласно требованиям НД [5]. Испытуемая, готовая к применению питательная среда для культивирования и выделения туляреминого микроба, изготовлена на основе сернокислотного гидролизата рыбной муки с цистеином, стимулятором роста гемофильных бактерий и глюкозо-витаминной добавкой (глюкоза, тиамин хлорид, кальция пантотенат), по составу аналогична FT-агару. Однако, в отличие от FT-агара, данная среда выпускается готовой в стеклянных емкостях по 250 мл в качестве агаровой основы. Глюкозо-витаминная добавка прилагается к комплекту агаровой основы и выпускается по 5 мл в стеклянном флаконе. После расплавления и охлаждения до 45–50 °C агаровой основы, в стерильных условиях в нее добавляется раствор глюкозо-витаминной добавки согласно рекомендациям фирмы-производителя. После перемешивания питательную среду разливают в чашки Петри и используют в испытании.

По ростовым свойствам обе питательные среды соответствовали требованиям НД. При посеве 10 м.к. вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ после инкубирования при температуре (37 ± 1) °C в течение 2 сут питательные среды обеспечивали рост единичных (от 5 до 7) колоний, что подтверждает их чувствительность. При посеве 100 м.к. вакцинного штамма показатель прорастания питательных сред составил от 70 до 73 % от посевной дозы. Морфология выросших колоний вакцинного штамма на обеих питательных средах после инкубирования при температуре (37 ± 1) °C в течение 5 сут была идентична. Из общего количества выросших колоний, число иммуногенных SR-типа белого цвета на FT-агаре составило 88 %, на испытуемой среде — 90 %. Степень диссоциации в виде неиммуногенных колоний серого цвета на FT-агаре составила 8 %, на испытуемой среде — 10 %, что не превышает 20 % от общего числа выросших колоний (рис. 3 и 4). Таким образом, используемые питательные среды обеспечивают стабильность основных биологических свойств микроорганизма. При сравнительном высеве образцов вакцины на обеих средах были получены близкие значения количества колониеобразующих единиц вакцинного штамма. Результаты во всех опытах показали незначительные колебания (от 5 до 12 %), входящие в 20 % диапазон, приемлемый для биологических методов. В итоге, рассчитанные количества накожных и внутрикожных доз вакцины в одной ампуле по результатам выросших коло-

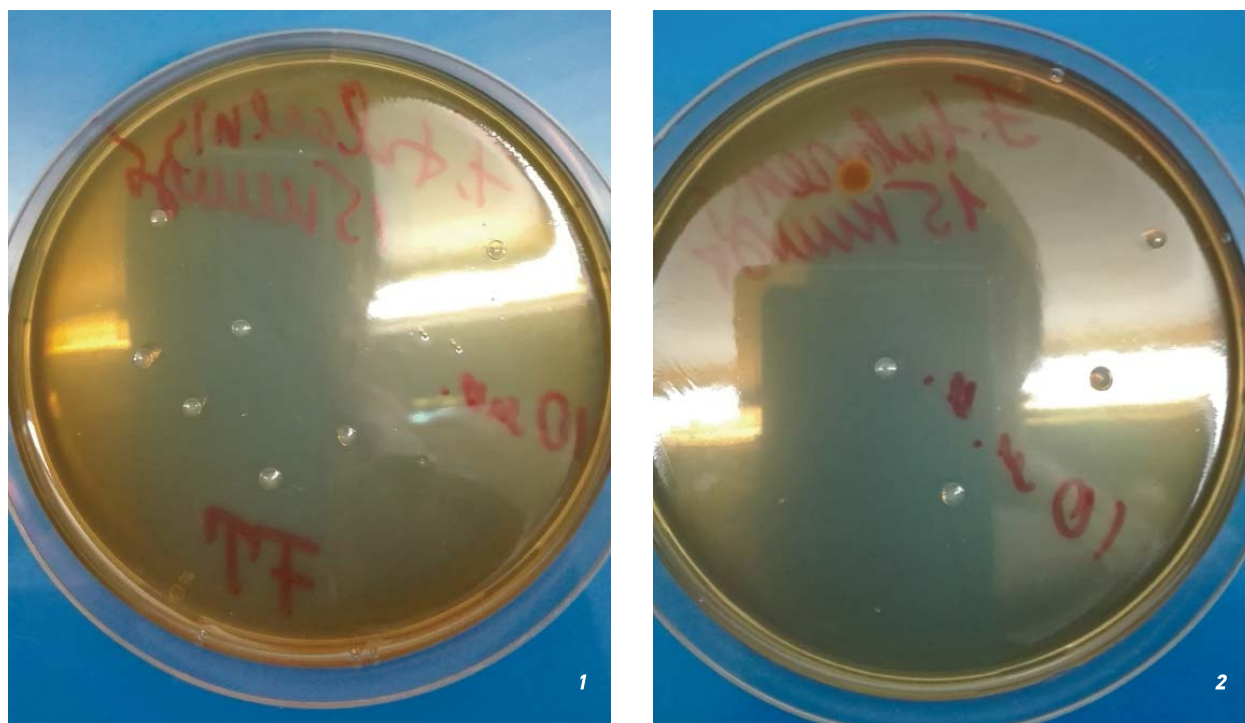


Рис. 3. Колонии вакцинного штамма *F. tularensis*, выращенные при посеве 10 м.к. после инкубирования при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ на FT-агаре (чашка 1) и на готовой к применению питательной среде (чашка 2) в течение 5 сут.

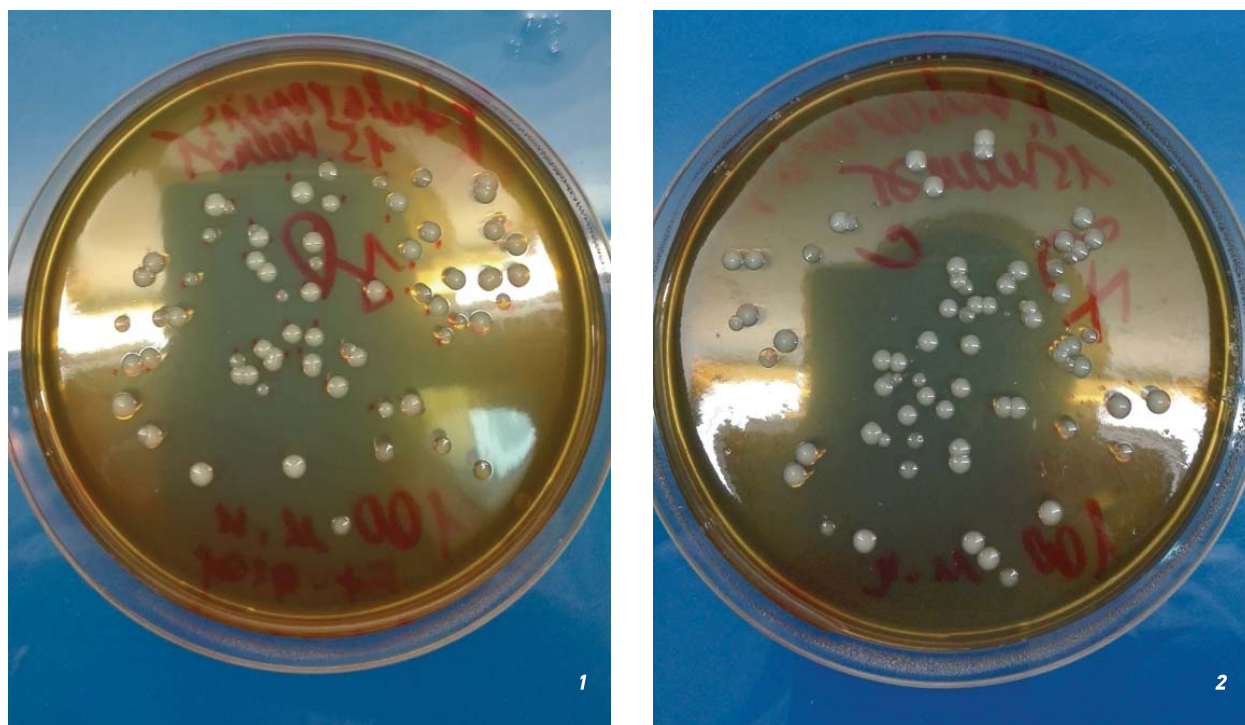


Рис. 4. Колонии вакцинного штамма *F. tularensis*, выращенные при посеве 100 м.к. после инкубирования при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ на FT-агаре (чашка 1) и на готовой к применению питательной среде (чашка 2) в течение 5 сут.

ний на обеих питательных сред, соответствовали друг другу.

Но учитывая экономические и практические показатели проведения экспертизы качества, готовая питательная среда более выгодна и удобна в применении, поскольку не требует предварительной подготовки лабораторной

посуды (мытья, укупорки и стерилизации), необходимости приготовления в лабораторных условиях (исключаются этапы взвешивания, растворения и кипячения компонентов среды, ее стерилизации). Кроме того, условия промышленного выпуска гарантируют стандартность ее состава.



Рис. 5. Результаты посева и последующего пересева на 5-е сут стандартного образца № 1 вакцины туляреминой, пробирки 1, 6 – контроль среды.



Рис. 6. Результаты посева без последующего пересева стандартного образца вакцины туляреминой, пробирки 1, 3 — контроль среды.

Таким образом, питательная среда для культивирования и выделения туляреминого микроба, готовая к применению, может быть рекомендована для внесения в нормативную документацию на вакцину туляреминовую живую как альтернативная питательная среда для определения показателя «Специфическая активность (количество живых микробных клеток)».

В настоящее время испытание вакцины туляреминой по показателю «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов» проводят в соответствии с требованиями НД и ГФ XIII ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» методом прямого посева с использованием только тиогликолевой среды [12]. Каждый испытуемый образец препарата растворяют в 1 мл растворителя (0,9 % раствор натрия хлорида) и высевают в соотношении 1:20 в две емкости с тиогликолевой средой. Посевы инкубируют при двух температурных режимах ($32,5 \pm 2,5$ °C и $(22,5 \pm 2,5)$ °C в течение 14 сут. На 5–7 сутки проводят пересев на тиогликолевую среду. На 14 сутки проводят предварительный учет результатов испытания. В период инкубирования наблюдается появление в верхнем слое питательной среды слабой опалесценции, как специфического признака роста микробных клеток туляреминого вакцинного штамма в виде мелких облаковидных нежных образований на фоне прозрачной среды. Далее из каждой пробирки с посевом и «пересевом» готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют и проводят окончательный учет результатов. Препарат считают прошедшим испытание при наличии в мазке только культуры туляреминого вакцинного штамма (мелкие граммотрицательные кокковидные палочки).

Многочисленные испытания туляреминой вакцины (25 коммерческих серий), проведенные в Испытательном

центре экспертизы качества МИБП, по показателю «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов» показали, что зона облаковидных образований и слабой опалесценции в первичном посеве и «пересеве» не меняется, сохраняя специфические признаки роста микробных клеток туляреминого штамма.

Особенностями ростовых свойств туляреминого микроба в жидких питательных средах является то, что его размножение происходит медленно и плохо (скудный рост по поверхности среды), что связано с аэрофильностью бактерий. Лучшими средами для выращивания бактерий туляремии являются полужидкие среды при добавлении к жидким средам коллоидов (куриного желтка, агар и т.д.), либо при аэрации среды [9–11].

В целях демонстрации отличий ростовых особенностей различных возбудителей особо опасных инфекций, нами были проведены сравнительные испытания стандартных образцов вакцины туляреминой живой (ОСО 42-28-398-2016) серии 7 и вакцины чумной живой серии 1-17 по показателю «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов». На фотографиях (рис. 6, 7 и 8) представлены результаты испытания. Посевы вакцины туляреминой, культивируемые при обеих температурах в течение 14 сут, по степени мутности визуально не отличались от контрольной незасеянной среды. В посевах вакцины туляреминой наблюдалась лишь легкая опалесценция в верхней части пробирки (рис. 6). В отличие от туляреминого микроба, чумной микроб дает обильный хлопьевидный рост (рис. 7). В связи с этим, «пересев» вакцины чумной на 5–7 сутки необходим, так как визуально нельзя отличить рост специфического микроорганизма от роста контаминанта. На рисунке 8 показаны результаты



Рис. 7. Результаты посева без последующего пересева стандартного образца вакцины туляремийной (пробирки 1–4) и образцов вакцины чумной живой (пробирки 5 и 6), пробирки 1, 3 — контроль среды.

посева и «пересева» чумной вакцины. При «пересеве» наблюдается специфический рост чумного микроба (единичные хлопьевидные включения без помутнения питательной среды). Далее, в соответствии с требованиями НД необходимо проводить идентификацию микроорганизма микроскопией мазков, окрашенных по Граму.

На основании полученных результатов считаем возможным внесение изменений в методику проведения испытания вакцины туляремийной живой по показателю «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов» путем исключения стадии «пересева» на 5–7 сут. Совершенствование методики проведения испытания вакцины туляремийной живой по показателю «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов» экономически и практически целесообразно, а также уменьшит риск возможности получения ложноположительных результатов.

Выводы

1. Перспектива совершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной по показателю «Подлинность» состоит в применении коммерческого диагностического набора реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии («ИХ тест-система *F. tularensis*») в качестве альтернативного способа идентификации туляремийного микроба. При проведении данного испытания рекомендуемые концентрации вакцины составляют 10^8 и 10^9 м.к./мл.

2. Для усовершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной по показателю «Специфическая активность (количество живых микробных клеток)» реко-



Рис. 8. Результаты посева образца № 5 (пробирки 1 и 3) и последующего пересева (пробирки 2 и 4) образцов вакцины чумной живой.

мендована к использованию в качестве альтернативной готовая к применению питательная среда для культивирования и выделения туляремийного микроба.

3. Усовершенствование методики проведения экспертизы качества вакцины туляремийной по показателю «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов» в виде исключения стадии пересева на 5–7 сутки экономически и практически целесообразно.

Литература

1. Касина ИВ, Горяев АА, Ращепкин ЛИ, Фадейкина ОВ, Немировская ТИ, Устинникова ОБ и др. Аттестация и продление срока годности новой серии отраслевого стандартного образца специфической активности и иммуногенности вакцины туляремийной живой. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2015; (4): 32–8.
2. Касина ИВ, Ращепкин ЛИ, Горяев АА, Алексеева СА, Немировская ТИ, Мовсисянц АА. Оценка качества вакцины туляремийной живой по результатам испытаний в рамках обязательной сертификации. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16(4): 253–9.
3. Мовсисянц АА, Миронов АН, Меркулов ВА, Борисевич ИВ. Цели и задачи испытательного центра экспертизы качества иммунобиологических лекарственных препаратов. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2012; (1): 7–9.
4. Мовсисянц АА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (2): 38–41.
5. ФС.3.3.1.0019.15. Вакцина туляремийная живая. XIII изд. Т. 3. М.; 2015. С. 923–30. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.

6. ОФС.1.8.1.0002.15. Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. М.; 2015. С. 867–79. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
7. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Онищенко ГГ, Кутырев ВВ, ред. М.; «Шико», 2013. С. 522–3.
8. Дятлов ИА, Кутырев ВВ, Храмов МВ. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. М.; 2012. С. 383–90.
9. Шепелин ИА, Миронов АЮ, Шепелин КА. Возбудители особо опасных бактериальных инфекций. Справочник бактериолога. М.; 2016.
10. Мещерякова ИС. Таксономия, идентификация и иммунологическая диагностика туляремии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 1990.
11. Поздеев ОК. Медицинская микробиология. М.; 2004: 392–4.
12. ОФС. 1.2.4.0003.15. Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. С. 925–46. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.

Об авторах

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

Касина Ирина Владимировна. Главный эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Алексеева Светлана Александровна. Ведущий эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Бердникова Зинаида Евтропиевна. Главный эксперт лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Немировская Татьяна Ивановна. Начальник лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Алехина Александра Сергеевна. Инженер-лаборант лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Адрес для переписки: Касина Ирина Владимировна; Kasina@expmed.ru

Prospects for improving evaluation of live tularemia vaccine quality

I. V. Kasina, S. A. Alekseeva, Z. E. Berdnikova, T. I. Nemirovskaya, A. S. Alekhina

Federal State Budgetary Institution

«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»

of the Ministry of Health of the Russian Federation,

Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

The article presents prospects for improving the evaluation of live tularemia vaccine (hereinafter — tularemia vaccine) quality in terms of the following parameters: «Identification», «Specific activity (the number of living microbial cells)» and the «Absence of extraneous microorganisms and fungi». The authors investigated the possibility of improving evaluation of tularemia vaccine quality as regards the «Identification» parameter by using a commercial diagnostic test kit — immunochromatographic test system for express detection and identification of tularemia agent («*F. tularensis* ICA test system»). In order to optimize and improve the evaluation of tularemia vaccine quality as regards «Specific activity (the number of living microbial cells)» parameter it is recommended to use a ready-to-use growth medium for cultivation and isolation of tularemia microbe — as an additional culture medium for determination of the number of living microbial cells. It is proposed to improve the methodology of tularemia vaccine quality evaluation as regards the «Absence of foreign microorganisms and fungi» parameter by eliminating the stage of subculturing material in thioglycollate medium for 5–7 days, which is reasonable from economic and practical points of view and also reduces the risk of false positive results.

Key words: *Francisella tularensis*; live tularemia vaccine; identification; specific activity; number of living microbial cells; growth medium for cultivation and isolation of tularemia microbe (FT agar); branch standard sample.

Bibliographic description: Kasina IV, Alekseeva SA, Berdnikova ZE, Nemirovskaya TI, Alekhina AS. Prospects for improving evaluation of live tularemia vaccine quality. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(4): 240–247.

References

1. Kasina IV, Goryaev AA, Rashchepkin LI, Fadeykina OV, Nemirovskaya TI, Ustinnikova OB et al. Certification and shelf-life extension of a new batch of the branch reference standard for live tularemia vaccine's specific activity and immunogenicity. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015; (4): 32–8 (in Russian).
2. Kasina IV, Raschepkin LI, Goryaev AA, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI, Movsesyants AA. Live tularemia vaccine quality assessment according to test results under the mandatory certification. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(4): 253–9 (in Russian).
3. Movsesyants AA, Mironov AN, Merkulov VA, Borisevich IV. Aims and objectives Testing Center for Quality Expertise of Medical Immunobiological Preparations. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2012; (1): 7–9 (in Russian).
4. Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Shmchuk LF. Quality standards for immunobiological medicinal products — new texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2016; (2): 38–41 (in Russian).
5. ОФС.3.3.1.0019.15. The tularemia vaccine live. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th ed. V. 3. P. 923–30. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).

6. OFS.1.8.1.0002.15. *Immunobiological medicinal products. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 2. P. 867–79. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).*
7. *Laboratory diagnosis of infectious diseases. A practical guide. Onishchenko GG, Kutyrev VV, eds. Moscow: «Shiko»; 2013. P. 522–3 (in Russian).*
8. Dyatlov IA, Kutyrev VV, Khramov MV. *Nutrient medium for isolation, cultivation and identification of pathogens of especially dangerous infections of bacterial nature. Moscow; 2012. P. 383–90 (in Russian).*
9. Shebalin IA, Mironov AY, Shepelin KA. *causative Agents of especially dangerous bacterial infections. Reference bacteriologist. Moscow; 2016 (in Russian).*
10. Meshcheryakova IS. *Taxonomy, identification and immunological diagnosis of tularemia. Dr. Med. Sci. [authoref. dissertation] Moscow; 1990 (in Russian).*
11. Pozdeev OK. *Medical Microbiology. Moscow; 2004. P. 392–4 (in Russian).*
12. OFS.1.2.4.0003.15. *Sterility. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 1. P. 925–46. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).*

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Kasina IV. Chief expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Alekseeva SA. Leading expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Berdnikova ZE. Chief expert of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Nemirovskaya TI. Head of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Alekhina AS. Lab technician of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Contact e-mail: Kasina Irina Vladimirovna; Kasina@expmed.ru

Аттестация отраслевого стандартного образца содержания антиальфастафилолизина и некоторые аспекты его практического применения

Е. А. Хуснатдинова, Е. С. Коновалова, О. В. Фадейкина, Р. А. Волкова,
Н. И. Кишкурно, Э. Ю. Кудашева, Д. В. Шведов

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

Поступила 06.07.2017 г. Принята к публикации 26.10.2017 г.

Представлены материалы по аттестации кандидата в отраслевой стандартный образец содержания антиальфастафилолизина ОСО 42-28-342-2017, серия № 34, дата выпуска 01.04.2017 г., срок годности до 01.04.2018 г. В соответствии с Программой аттестации стандартного образца в реакции нейтрализации гемолитических свойств токсина стафилококкового экспериментально установлен диапазон значений аттестованной характеристики кандидата в ОСО по отношению к Международному стандартному образцу В03 (21 ± 2 МЕ/мл). ОСО содержания антиальфастафилолизина может быть использован для количественного определения содержания антител к стафилококковому экзотоксину (альфастафилолизину) в реакции нейтрализации гемолитических свойств токсина стафилококкового (альфатоксина) специфическими антителами в плазме крови человека и в ряде групп биологических лекарственных препаратов (иммуноглобулинах человека нормальных и специфических, анатоксинах стафилококковых очищенных и адсорбированных, токсине стафилококковом диагностическом).

Ключевые слова: отраслевой стандартный образец; антиальфастафилолизин; Международный стандартный образец; иммуноглобулин человека; специфическая активность; стафилококковый анатоксин.

Библиографическое описание: Хуснатдинова ЕА, Коновалова ЕС, Фадейкина ОВ, Волкова РА, Кишкурно НИ, Кудашева ЭЮ, Шведов ДВ. Аттестация отраслевого стандартного образца содержания антиальфастафилолизина и некоторые аспекты его практического применения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2017; 17(4): 248–252.

Подтверждение специфической активности основного действующего вещества биологических фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, получаемых из них, является обязательным требованием при оценке их качества, эффективности и безопасности [1].

Специфическую активность биологических лекарственных препаратов изучают с помощью различных методов количественного определения содержания антигена или другого активного компонента. Показатели специфической активности, критерии и методы их оценки (*in vitro* и/или *in vivo*) зависят от групповой и видовой принадлежности биологического лекарственного препарата.

Обязательным условием при подтверждении специфической активности является использование соответствующих стандартных образцов, откалиброванных по отношению к Международным стандартным образцам (МСО) при их наличии [2, 3].

Количественное определение содержания антител к стафилококковому экзотоксину (альфастафилолизину) в реакции нейтрализации гемолитических свойств токсина стафилококкового (альфатоксина) специфическими антителами рекомендуется для подтверждения специфической активности отдельных видов биологических лекарственных препаратов: иммуноглобулина человека противостафилококкового (показатель «Специфическая активность»), анатоксинов стафилококковых очищенного и очищенного адсорбированного для подкожного введения (показатель «Специфическая активность (иммуногенность)»),

анатоксина стафилококкового очищенного, раствора для подкожного введения (показатель «Антигенная активность»), токсина стафилококкового диагностического (показатель «Лимит гемолитического действия (Lh)») [4, 5].

Для стандартизации методики используют МСО или отраслевой стандартный образец содержания антиальфастафилолизина (ОСО 42-28-342), откалиброванный по отношению к нему [6].

МСО представляет собой лиофилизированную иммунную сыворотку крови лошади, содержащую антитела к антиальфастафилолизину в количестве 220 МЕ в ампуле.

ОСО 42-28-342 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России – глицериновый раствор очищенной концентрированной гипериммунной сыворотки крови лошади, с установленным количественным содержанием антител к альфастафилолизину по сравнению с МСО.

Целью работы является проведение аттестации кандидата в ОСО содержания антиальфастафилолизина в соответствии с современными требованиями и рассмотрение некоторых аспектов его практического применения.

Материалы и методы

Материалы

1. Кандидат в ОСО 42-28-342-2017 — глицериновый раствор очищенной концентрированной гипериммунной сыворотки крови лошади, иммунизированной стафилококковым анатоксином (10 флаконов по 10 мл).

2. Набор реагентов для определения уровня антиальфастафилолизина в сывороточных препаратах крови человека и животных «Токсин стафилококковый диагностический», серия 69, срок годности до 05.18, производитель филиал «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, соответствует ТУ 9383-001-01894956-2009. Токсин стафилококковый диагностический представляет собой стерильный фильтрат бульонной культуры стафилококка (штамм *Staphylococcus aureus* 0-15).

3. Международный стандартный образец антиальфастафилолизина (WHO International Standard. The 3rd International Standard for *Staphylococcus Alpha Antitoxin*, Equine. NIBSC code: STA).

4. 15 % взвесь эритроцитов кролика-донора свежеприготовленная.

5. 0,9 % раствор натрия хлорида, ООО «Мосфарм», Россия.

Методы

Содержание антител к антиальфастафилолизину определяли в реакции нейтрализации гемолитических свойств стафилококкового альфатоксина [7].

Расчет математических параметров (среднего значения, стандартного отклонения, доверительного интервала) с доверительной вероятностью 0,95 выполняли по Гланцу [8], с использованием программного обеспечения MS Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Иммунологическая реакция, используемая для определения аттестуемой характеристики отраслевого стандартного образца содержания антиальфастафилолизина, основана на способности специфических антител, присутствующих в ОСО, нейтрализовать гемолитические свойства токсина стафилококкового диагностического.

Установление значения аттестуемой характеристики кандидата в ОСО проводили в лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в соответствии со специально разработанной Программой, определяющей алгоритм ее проведения двумя аналитиками (операторами). Каждый аналитик проводил испытание пяти образцов.

Программа включает два последовательно выполняемых этапа: подготовку к аттестации и экспериментальные исследования аттестуемой характеристики.

Для проведения реакции МСО смешивали в разных разведениях с токсином стафилококковым диагностическим, для индикации реакции в смесь добавляли 15 % взвесь эритроцитов кролика-донора, уровень содержания

антиальфастафилолизина в сыворотке крови которого не превышал 0,125 МЕ/мл. Непосредственно в день проведения аттестации устанавливали лимит гемолитического действия серии используемого токсина (Lh) в опыте. За лимит гемолитического действия токсина принимали минимальное количество стафилококкового токсина, которое, будучи связано с 1 МЕ МСО антиальфастафилолизина, вызывало почти полный гемолиз (+++) эритроцитов кролика, взятых в опыт. Разведения токсина готовили, исходя из значения величины Lh испытуемого стафилококкового токсина, указанного в паспорте производителя (0,14 мл). В ряд пробирок вносили соответствующее количество токсина с интервалом в 0,01 мл с последующим добавлением международного отраслевого стандартного образца антиальфастафилолизина и 15 % суспензии эритроцитов кролика в соответствии со схемой (табл. 1).

По окончании инкубации устанавливали значение лимита гемолитического действия токсина (табл. 2).

Далее готовили рабочие разведения токсина стафилококкового диагностического, общий объем рабочего раствора токсина рассчитывали, исходя из полученного значения Lh.

Точность рабочей дозы токсина оценивали в контрольном ряду с разведением МСО (от 0,12 до 0,08 МЕ/мл), рабочий раствор токсина и 15 % суспензию эритроцитов кролика, внесенными по схеме. Подтверждением правильности использованной рабочей дозы токсина являлся гемолиз 50 % (+ +) эритроцитов крови кролика, который отмечали в пробирке, содержащей 0,1 МЕ МСО (табл. 3).

Значение аттестуемой характеристики кандидата в ОСО определяли, внося необходимые объемы разведений кандидата (мл), рабочих разведений токсина (мл), 15 % взвеси эритроцитов крови кролика (мл) в соответствии со схемой внесения испытуемых образцов, регламентированной статьей Государственной фармакопеи Российской Федерации «Определение содержания антиальфастафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных» [7].

Полученные результаты аттестации кандидата в ОСО представлены в таблице 4.

Таким образом, диапазон значений аттестованной характеристики кандидата в ОСО содержания антиальфастафилолизина ОСО 42-28-342-2017 [9], серии 34, установленный по отношению к МСО, при проведении исследования двумя операторами, рассчитанный как $X_{cp} \pm 2S_x$, составил 21 ± 2 МЕ/мл.

При соблюдении условий хранения ОСО при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте и транспортирования всеми видами крытого транспорта согласно СП 3.3.2.3332-16 [10] при температуре не выше 8 °С, диапазон значений аттестованной характеристики (21 ± 2 МЕ/мл) ста-

Таблица 1. Схема внесения проб для определения значения лимита гемолитического действия серии используемого токсина (Lh)

Количество токсина, мл	0,11	0,12	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	Контроль эритроцитов
0,9 % раствор натрия хлорида, мл	0,89	0,88	0,87	0,86	0,85	0,84	0,83	2,0
МСО МЕ/мл, мл	1	1	1	1	1	1	1	—
Пробирки встряхивают и выдерживают 15 мин, 18–22 °С								
15 % взвесь эритроцитов	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Пробирки встряхивают и выдерживают 1 ч, 37±1 °С								

Таблица 2. Определение значения лимита гемолитического действия серии используемого токсина (Lh)

Исполнитель (оператор)	Наименование образца	Количество токсина, мл							Контроль эритроцитов
		0,11	0,12	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	
1	1	–	±	±	+	++	+++	++++	–
	2	–	±	+	+	++	++	+++	–
	3	–	+	+	+	++	+++	++++	–
	4	–	–	±	+	+	++	+++	–
	5	±	±	+	++	++	+++	+++	–
2	1	±	+	++	++	+++	+++	++++	–
	2	+	+	++	++	+++	++++	++++	–
	3	–	+	++	++	+++	++++	++++	–
	4	–	±	+	+	++	+++	++++	–
	5	±	+	++	++	+++	+++	++++	–

Примечание. Здесь и в таблице 3: «++++» — полный гемолиз эритроцитов; «+++» — почти полный гемолиз эритроцитов; «++» — частичный гемолиз (50 %); «+» — следы гемолиза эритроцитов; «–» — отсутствие гемолиза эритроцитов.

Таблица 3. Результаты в контрольном ряду

Учет реакции (исполнитель)	Количество антиальфафафилолизина МСО в пробирке, мл					Контроль токсина	Контроль эритроцитов
	0,12	0,11	0,10	0,09	0,08		
Визуальный (1)	–	+	++	++	+++	++++	–
Визуальный (2)	–	+	++	++	+++	++++	–
Фотометрический ($\lambda = 400$ нм) (1)	0,02	0,19	0,354	0,37	0,44	0,591	0,01
Фотометрический ($\lambda = 400$ нм) (2)	0,06	0,25	0,371	0,40	0,46	0,6	0,06

билен в течение установленного срока годности, указанного в паспорте на научно-техническую продукцию — 12 месяцев.

Спектр практического применения ОСО содержания антиальфафафилолизина не ограничен только стандартизацией метода подтверждения специфической активности биологических лекарственных препаратов, предназначенных для профилактики и лечения стафилококковой инфекции.

Таблица 4. Результаты определения значения аттестуемой характеристики кандидата в ОСО содержания антиальфафафилолизина ОСО 42-28-342-2017 (опытный ряд)

Исполнитель (оператор)	Содержание антиальфафафилолизина, МЕ/мл				
	ОСО			МСО	
	Флакон №	x	$x \pm S_x$	x	$x \pm S_x$
1	1	22	$22 \pm 0,4$	22	21 ± 2
	2	22		22	
	3	22		22	
	4	23		23	
	5	22,5		21,5	
2	1	21	$20 \pm 0,5$	21	21 ± 2
	2	20		20	
	3	20		20	
	4	21		21	
	5	20		20	

ОСО содержания антиальфафафилолизина возможно использовать и в производственной и клинической трансфузиологии для оценки эффективности иммунизации доноров стафилококковым анатоксином при получении иммунной противостафилококковой плазмы для переливания или для производства препаратов специфического иммуноглобулина человека.

Для оценки достижения надлежащей степени концентрирования антибактериальных антител в процессе производства препаратов иммуноглобулинов человека (не менее чем в 3 раза при содержании белка в препарате 4,5–5,5 % и не менее чем в 6 раз при содержании белка в препарате 9,0–11,0 %) в качестве индикаторных антител может быть использовано определение содержания антител к стафилококковому экзотоксину в реакции нейтрализации гемолитических свойств стафилококкового альфа-токсина с использованием аттестованного отраслевого стандартного образца.

Выводы

1. Проведена аттестация серии кандидата в ОСО содержания антиальфафафилолизина ОСО 42-28-342-2017 по сравнению с МСО в соответствии с Программой аттестации, разработанной в соответствии с современными требованиями и рекомендациями ВОЗ.

2. Значение аттестуемой характеристики (количественное содержание антиальфафафилолизина) 21 ± 2 МЕ/мл, документация на ОСО оформлена с учетом отечественных требований к стандартным образцам.

3. Диапазон значения аттестованной характеристики (21 ± 2 МЕ/мл) стабилен в течение установленного паспор-

том на научно-техническую продукцию срока годности — 12 месяцев.

Литература

1. Использование иммуноглобулина человека. Доклад Комитета экспертов ВОЗ. ВОЗ, серия технических докладов № 327. Женева, 1968.
2. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Климов ВИ, Саканян ЕИ, Олещук ЮВ, Меркулов ВА и др. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16(4): 229–36.
3. Миронов АН, Сакаева ИВ, Саканян ЕИ, Бунятян НД, Ковалева ЕЛ, Митькина ЛИ и др. Стандартные образцы в практике зарубежного и отечественного фармацевтического анализа. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2012; (3): 56–60.
4. ФС. 3.3.1.0005.15. Анатоксин стафилококковый очищенный адсорбированный, суспензия для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. М.; 2015. С. 809–16. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
5. ФС. 3.3.1.0006.15. Анатоксин стафилококковый очищенный, раствор для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. М.; 2015. С. 817–25. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
6. *Staphylococcus-alpha antitoxin, equine. Lyophilized, 220 IU. 3rd International Standard. WHO International Biological Reference Preparations.* 2017. P. 21. Available from: <http://www.who.int/bloodproducts/ref materials/>.
7. ОФС. 1.8.2.0008.15. Определение содержания антиальфа-стафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. М.; 2015. С. 949–58. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.
9. Научно-техническая продукция. Реализация штаммов и отраслевых стандартных образцов ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России. Available from: http://www.regmed.ru/content/page/EXPERTISE_Strains_Purchase.
10. Постановление Главного государственного врача РФ от 17 февраля 2016 г. № 19 «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 3.3.2.3332-16 «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов».

Об авторах

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

Хуснатдинова Екатерина Александровна. Эксперт 1 категории лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Коновалова Екатерина Сергеевна. Эксперт 2 категории лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Фадейкина Ольга Васильевна. Главный технолог Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р. биол. наук.

Кишкурно Наталья Игоревна. Старший специалист по интеллектуальной собственности отдела редакционно-издательской деятельности и защиты интеллектуальной собственности Центра планирования и координации научно-исследовательских работ

Кудашева Эльвира Юрьевна. Начальник лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Шведов Дмитрий Владимирович. Заместитель начальника Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Адрес для переписки: Хуснатдинова Екатерина Александровна, Husnatdinova@expmed.ru

Certification of the branch standard sample of anti-alpha-staphylolysin content, and some aspects of its use

E. A. Khusnatdinova, E. S. Konovalova, O. V. Fadeykina, R. A. Volkova,
N. I. Kishkurno, E. Yu. Kudasheva, D. V. Shvedov

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

The article summarises materials on the certification of a candidate branch standard sample (BSS) of anti-alpha-staphylolysin content — OSO 42-28-342-2017 FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, batch No. 34, production date April 1, 2017, expiry date April 1, 2018. According to the Certification programme the reaction of neutralization of staphylococcal toxin hemolytic properties was carried out to establish the range of the certified property of the candidate BSS against the WHO international standard (21 ± 2 IU/ml). The BSS of anti-alpha-staphylolysin content can be used for quantitative determination of antibodies to staphylococcal exotoxin (alpha-staphylolysin) in the reaction of neutralization of staphylococcal toxin (alpha-toxin) hemolytic properties by specific antibodies present in human blood plasma and in a number of biologicals (normal and specific human immunoglobulins, purified and adsorbed staphylococcal toxins, and diagnostic staphylococcal toxin).

Key words: branch standard sample; anti-alpha-staphylolysin; international standard; human immunoglobulin; specific activity; staphylococcal anatoxin.

For citation: Khusnatdinova EA, Konovalova ES, Fadeykina OV, Volkova RA, Kishkurno NI, Kudasheva EYu, Shvedov DV. Certification of the branch standard sample of anti-alpha-staphylolysin content, and some aspects of its use. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(4): 248–252.

References

1. Immunoglobulin for human use. Report of the WHO Expert Committee. WHO, Series of Technical Reports № 327. Geneva, 1968.
2. Volkova RA, Fadeikina OV, Klimov VI, Sakanyan EI, Olefir YuV, Merkulov VA et al. Topical issues related to reference standards in the sphere of circulation of biological products. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(4): 229–36 (in Russian).
3. Mironov AN, Sakaeva IV, Sakanyan EI, Bunyatyan ND, Kovaleva EL, Mitkina LI et al. Reference standards in international and domestic pharmaceutical analysis. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2012; (3): 56–60 (in Russian).
4. FS. 3.3.1.0005.15. Anatoxin staphylococcal purified adsorbed, suspension for subcutaneous administration. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th ed. V. 3. P. 809–16. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
5. FS. 3.3.1.0006.15. Staphylococcal anaphylaxis purified, solution for subcutaneous administration. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th ed. V. 3. P. 817–25. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
6. *Staphylococcus-alpha antitoxin, equine*. Lyophilized, 220 IU. 3rd International Standard. WHO International Biological Reference Preparations. 2017. P. 21. Available from: <http://www.who.int/bloodproducts/ref/materials/>.
7. OFS. 1.8.2.0008.15. Determination of the content of anti-alpha-staphylolysin (specific antibodies) in medicinal preparations from human and animal blood serum. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th ed. V. 2. P. 949–58. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
8. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. Moscow: Praktika; 1999 (in Russian).
9. *Scientific and technical products. Realization of strains and industry standard samples of FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia*. Available from: http://www.regmed.ru/content/page/EXPERTISE_Strains_Purchase (in Russian).
10. Decree of the Chief State Doctor of the Russian Federation of February 17, 2016 № 19 «On the approval of sanitary and epidemiological rules SP 3.3.2.3332-16 Conditions for the transport and storage of immunobiological medicinal products» (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation. Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Khusnatdinova EA. 1st professional category expert of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Konovallava ES. 2nd professional category expert of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Fadeykina OV. Chief technologist of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Volkova RA. Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Biological Sciences.

Kishkurno NI. Senior intellectual property specialist of the Department for Editorial and Publishing Activities and Intellectual Property Protection of the Centre for Planning and Coordination of Scientific Activities.

Kudashева EYu. Head of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Shvedov DV. Deputy head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Contact e-mail: Khusnatdinova Ekaterina Aleksandrovna, Husnatdinova@expmed.ru

Исследование защитного действия туберкулезных вакцин в эксперименте

Д. Т. Леви, Н. В. Александрова, Е. В. Лебединская, А. В. Наконечная

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

Поступила 11.10.2017 г. Принята к публикации 26.10.2017 г.

Проведен ретроспективный анализ данных изучения в эксперименте протективных свойств трех посевных серий туберкулезных вакцин, которые использовались при производстве вакцины БЦЖ и БЦЖ-М с 1984 г. по настоящее время. Показано, что эти серии характеризовались одинаковыми показателями жизнеспособности, что обуславливало их равнозначную иммуногенность. Дополнительное исследование протективных свойств препаратов было проведено на морских свинках, вакцинированных производственными сериями туберкулезных вакцин, содержащими в прививочной дозе различное количество жизнеспособных клеток БЦЖ. Заражение животных через 2,5 месяца после вакцинации вирулентным штаммом *M. tuberculosis* показало высокую иммуногенность туберкулезных вакцин. Установлено, что пятикратное уменьшение дозы вакцины с высоким содержанием жизнеспособных клеток БЦЖ незначительно снижает степень защиты животных от распространенного поражения туберкулезом внутренних органов. Таким образом, полученные данные подтвердили, что проведенное снижение на 30 % верхнего лимита показателя жизнеспособности (жизнеспособных клеток БЦЖ) туберкулезных вакцин БЦЖ и БЦЖ-М с целью уменьшения их реактогенности не влияет на защитные свойства препарата. Важно отметить, что проведенное ранее постмаркетинговое наблюдение за такими усовершенствованными вакцинами показало значительное снижение количества поствакцинальных осложнений у детей.

Ключевые слова: вакцина БЦЖ; осложнения; показатель жизнеспособности; иммуногенность; туберкулез.

Библиографическое описание: Леви ДТ, Александрова НВ, Лебединская ЕВ, Наконечная АВ. Исследование защитного действия туберкулезных вакцин в эксперименте. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2017; 17(4): 253–257.

Вакцинопрофилактика является самым эффективным и экономичным способом борьбы с инфекционными заболеваниями. Эффективность вакцинации зависит от целого ряда факторов, связанных как с препаратом, так и с организмом прививаемого. Эти же факторы оказывают значительное влияние на возникновение осложнений после вакцинации. Значительную роль играет также корректность выполнения техники проведения прививки. Известно, что живые вакцины дают более полноценный эффект, чем инактивированные цельноклеточные или антигенные препараты, но и чаще вызывают осложненную реакцию на введение. До настоящего времени все вакцины против туберкулеза в мире носят название БЦЖ (BCG), что связано с тем, что их готовят из *M. bovis* BCG — штамма, выделенного от коровы, больной туберкулезной бугорчаткой (жемчужная болезнь), аттенуированного А. Кальметом и К. Гереном и названного в их честь. Созданный в 1921 г. французскими учеными аттенуированный штамм БЦЖ был предложен исследователям других стран для производства вакцин против туберкулеза [1]. При изготовлении вакцин БЦЖ производители использовали различную технологию. В результате дочерние штаммы БЦЖ, которые было принято называть субштаммами, отличаются от родительского и различаются между собой по морфологии клеток, антигенному составу, ростовым свойствам, способности вызывать гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ), остаточной вирулентности, от которой зависит реактогенность и защитные свойства вакцины [2, 3].

В начале 60 годов прошлого столетия ВОЗ рекомендовала ввести в производство БЦЖ систему посевного

материала (seed-lot system), ограничивающую двенадцатью число пассажей от приготовления посевной серии до выпуска производственной серии вакцины БЦЖ. На основании международных коллаборативных исследований, проведенных в 2008–2012 гг., в которых наша страна (ГИСК им. Л. А. Тарасевича) принимала непосредственное участие, ВОЗ утвердила 4 референс-субштамма для производства вакцины БЦЖ [4].

Согласно данным литературы, на вакцины, приготовленные на основе этих субштаммов, отмечаются различные по характеру и количеству осложнения, что связано, в основном, с остаточной вирулентностью субштамма, которую наряду с количеством жизнеспособных клеток должны учитывать при выборе дозы препарата [5, 6].

Специально запланированное исследование [7] показало, что с увеличением жизнеспособных клеток в препарате (в прививочной дозе) регистрируется пропорционально больше осложнений как после применения вакцины БЦЖ, так и вакцины БЦЖ-М. На серии вакцин, показатели жизнеспособности которых находились в пределах от среднего до нижнего допустимого лимита, было зарегистрировано в 2–4 раза меньше осложнений, чем на серии с показателем жизнеспособности на уровне верхней трети диапазона. Результатом этого исследования явилось усовершенствование профилактического препарата — изменение специфической активности серий вакцины БЦЖ и БЦЖ-М за счет снижения на 30 % количества жизнеспособных клеток БЦЖ в прививочной дозе [8, 9]. Следует подчеркнуть, что это уменьшение числа живых клеток произошло в пределах границ показателя специ-

фической активности (жизнеспособности) препаратов, за счет снижения верхнего лимита. С 2012 г. регламентирован выпуск серий вакцины БЦЖ, содержащих в прививочной дозе от 500 тыс. до 1 млн жизнеспособных клеток БЦЖ (было от 500 тыс. до 1,5 млн). Для вакцины БЦЖ-М первоначально был снижен верхний предел содержания жизнеспособных клеток БЦЖ в прививочной дозе до 625 тыс. (было 750 тыс.), а в последующем несколько изменен также нижний лимит (с 450 тыс. до 375 тыс.).

Несмотря на то, что вносимые изменения не выходят за рамки требований к вакцинам БЦЖ и БЦЖ-М, в данном исследовании проведен анализ результатов экспериментального изучения иммуногенности посевных серий туберкулезных вакцин, стандартность которых подтверждена, и дополнительные экспериментальные исследования иммунизирующей способности вакцин с уменьшенным количеством жизнеспособных клеток БЦЖ.

Цель исследования — оценить в эксперименте на морских свинок иммуногенность препаратов со сниженным количеством жизнеспособных клеток БЦЖ.

Материалы и методы

Материалы

1. *Mycobacterium bovis* BCG субштамм BCG-1 (Russia):
– посевная серия 367 «щ», лиофилизат (1982 г.) 12-дневной культуры 7 генерации посевной серии 359 «ш» (1966 г.) в 1,5 %-ном растворе натрия глутамата моногидрат;
– посевная серия 361 «ш», лиофилизат (1992 г.) 12-дневной культуры 7 генерации посевной серии 352 «ч» (1963 г.) в 1,5 %-ном растворе натрия глутамата моногидрат;
– экспериментальная посевная серия 368 «э», лиофилизат (1992 г.). Для производства вакцины БЦЖ не использовалась;
– посевная серия 368 «щ», лиофилизат (2006 г.) 12-дневной культуры культуры 7 генерации посевной серии 359 «ш» (1966 г.) в 1,5 %-ном растворе натрия глутамата моногидрат.

В каждой посевной серии в 1 мг содержится от 30 до 40 млн жизнеспособных клеток БЦЖ.

2. Вакцина БЦЖ сер. 733 и вакцина БЦЖ-М сер. 732, произведенные филиалом Медгамал ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи из посевной серии 368 «щ».

3. ОСО вакцины туберкулезной (БЦЖ) сухой ОСО 42-28-420 (использован при контроле показателя жизнеспособности).

4. Вирулентный тест-штамм *Mycobacterium tuberculosis* Erdman (700405, ГКПМ ФГБУ «НЦЭСМП»), лиофилизат. Культуру из ампулы высевали на яичную среду (1-я и 2-я генерации), а затем на картофельную среду Павловского (3-я генерация).

5. Питательные среды:

- яичная среда Левенштейна-Иенсена, свежеприготовленная (Приказ Минздрава России № 109 от 21.03.03 г.);

- картофельная среда Павловского (РП 1897357-06–07).

6. Животные (однополые): морские свинки массой 250–350 г из питомника филиал Андреевка ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА.

Методы

Определение протективных свойств вакцин

1. Для вакцинации морских свинок использовали препараты вакцины БЦЖ и БЦЖ-М (лиофилизат), которые разводили 0,9 % раствором натрия хлорида до содержания необходимой дозы жизнеспособных клеток БЦЖ в 0,1 мл препарата. Вакцину животным вводили внутрикожно.

2. Через 2,5 месяца после вакцинации животных заражали подкожно культурой третьей генерации *Mycobacterium tuberculosis* Erdman (700405) со среды Павловского. Доза заражения 0,0001 мг в 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. После гибели 2 морских свинок контрольной группы все животные были подвергнуты эвтаназии и обследованы визуально на наличие поражений туберкулезом лимфатических узлов и внутренних органов. Средний индекс поражений, подсчитывали по методу Нахимсон, при котором тотальное поражение селезенки, легких и печени животного принималось за 100 %.

3. Статистическую обработку и оценку полученных в исследованиях данных проводили с использованием параметрических и непараметрических методов статистики [10].

Результаты

В таблице 1 представлены результаты исследования протективных свойств 3 посевных серий вакцины БЦЖ.

Анализ этих данных показал, что в группах животных, вакцинированных тремя сериями посевного материала БЦЖ, средние индексы поражения различались статистически незначимо (31,1; 36,6 и 28,04 соответственно, при $P < 0,95$). Не было найдено статистически значимых различий и в количестве животных в этих группах, имеющих одинаковый индекс поражения ($P < 0,95$). Поражения туберкулезом морских свинок контрольной группы были значительно более выражены ($P > 0,95$). Так, у 11 из 13 (84,6 %) животных контрольной группы на вскрытии выявлен генерализованный туберкулез с индексом поражения 80–100 %. В группах животных, вакцинированных БЦЖ, аналогичные поражения отмечены только у 2 из 19 в первой группе, 3 из 23 — во второй и 3 из 22 — в третьей (10,5; 13,04 и 13,6 % соответственно). Количество вакцинированных животных, у которых туберкулезные поражения ограничены лимфатическими узлами, составляло 5 (26,3 %), 5 (21,7 %), и 9 (40,9 %) соответственно. В контрольной группе не было животных, имеющих туберкулез только регионарных лимфатических узлов; у одной морской свинки отмечены единичные узлы в селезенке; и у одной — выявлены поражения средней тяжести. Средний

Таблица 1. Результат определения на морских свинках протективных свойств 3 посевных серий вакцины БЦЖ

Посевная серия вакцины	Доза вакцины, мг	Доза заражения, мг <i>M. tuberculosis</i> Erdman	Количество морских свинок с индексом поражения				Количество животных в группе	Средний индекс поражения
			0–10	20–30	40–60	80–100		
361 «щ»	0,01	0,0001	5	9	3	2	19	31,1
368 «э»	0,01	0,0001	5	7	8	3	23	36,6
367 «щ»	0,01	0,0001	9	8	2	3	22	28,04
Контроль	—	0,0001	0	1	1	11	13	77,9

индекс поражения морских свинок в контрольной группе составлял 77,9, что статистически значимо выше, чем у вакцинированных животных любой группы (от 28,4 до 36,6). Таким образом, анализ результатов вакцинация морских свинок дозой 0,01 мг вакцины БЦЖ, содержащей 300–400 тыс. жизнеспособных клеток БЦЖ, подтвердил одинаково высокую иммуногенность посевных серий.

В таблице 2 представлены результаты исследования производственных серий вакцины БЦЖ, которые значительно различались между собой по показателю жизнеспособности и по количеству жизнеспособных единиц в прививочной дозе, использованной в опыте. В качестве препарата сравнения выбрана посевная серия вакцины БЦЖ 368 «щ», применяемая при производстве коммерческих серий вакцины с 2009 г. по настоящее время. В 1 мг этой серии содержится 35 ± 5 млн жизнеспособных клеток БЦЖ. Животные, вакцинированные посевной серией 368 «щ» (первая группа) и производственной серией вакцины БЦЖ 733 (третья группа), получили по 0,01 мг препарата, что составило 400 тыс. и 160 тыс. жизнеспособных клеток БЦЖ соответственно. Вакцина БЦЖ-М сер. 732 введена морским свинкам в дозе 0,005 мг. Аналогичную весовую дозу вакцины БЦЖ сер. 733 получили животные четвертой группы. Содержание жизнеспособных клеток в этих дозах составляло 115 тыс. и 80 тыс. соответственно. Анализ данных, полученных при вскрытии животных всех групп, зараженных вирулентным штаммом микобактерий туберкулеза, не выявил различий в поражениях внутренних органов животных, вакцинированных 0,01 мл вакцины БЦЖ сер. 733 и посевной серии. Средние индексы поражения в этих группах были одинаковыми (12,75 и 12,05 соответственно при $P < 0,95$). Вакцинация морских свинок 0,005 мг вакцины БЦЖ-М сер. 732 и уменьшенной вдвое весовой дозой вакцины БЦЖ сер. 733 также характеризовалась практически одинаковыми значениями индексов поражения (17,95 и 17,85 соответственно). Следует особо подчеркнуть отсутствие статистически значимых различий между индексами поражения туберкулезом в этих группах вакцинированных животных и морских свинок, вакцинированных 0,01 мг препаратов ($P < 0,95$). Как и в предыдущем испытании, у основной части (70 %) животных контрольной группы выявлены на вскрытии тотальные поражения (80–100 %) внутренних органов, которых не было ни у одного животного в вакцинированных группах. Основная часть вакцинированных морских свинок (66,7; 53,5; 66,7 и 60 % соответственно) демонстрировала туберкулезные поражения только в регионарных лимфатических узлах. В контрольной группе животные с таким

незначительным поражением отсутствовали. Полученные результаты свидетельствуют, что вакцинация морских свинок препаратами, содержащими 4–5-кратно различающиеся дозы жизнеспособных клеток БЦЖ, в одинаковой степени предотвращает или задерживает развитие туберкулезных поражений у чувствительных к туберкулезу животных.

Обсуждение

Известно, что вакцина БЦЖ вызывает относительный иммунитет против туберкулеза. Она не защищает взрослых от туберкулеза легких, не предупреждает инфицирования микобактериями туберкулеза. Тем не менее, ранняя вакцинация новорожденных позволяет предотвратить тяжелые генерализованные формы заболевания у ребенка и смертность малышей от туберкулеза [11]. Вакцина БЦЖ — живая вакцина, ее защитный эффект определяется остаточной вирулентностью, т.е. способностью размножаться внутриклеточно. Это же свойство вакцины приводит к неизбежности поствакцинальных осложнений, которые связаны, прежде всего, с реакцией регионарных лимфатических узлов, в результате которой происходит их увеличение. Увеличение размеров лимфатических узлов до 1 см и более считается осложнением — лимфаденитом (в большинстве стран учитывают только гнойные лимфадениты). Частоту лимфаденитов в результате вакцинации принято считать «маркером» реактогенности вакцины [1]. Известно, что «сильные» вакцины (вакцины из более реактогенных субштаммов БЦЖ) дают больший защитный эффект, но и больше лимфаденитов. Количество жизнеспособных клеток БЦЖ в препарате также влияет на реактогенность вакцины. С увеличением показателя жизнеспособности препарата увеличивается количество осложнений и нежелательных реакций. Во многих странах с целью снижения частоты осложнений для вакцинации новорожденных и детей младшего возраста применяется так называемая педиатрическая вакцина БЦЖ, которая является 1/2 или 1/4 обычной дозы вакцины БЦЖ. Так широко известная датская вакцина БЦЖ (наряду с болгарской вакциной используется по линии ЮНИСЕФ) содержит во флаконе 0,75 мг клеток БЦЖ, при этом в 1 мг препарата содержится от 2 до 8 млн жизнеспособных клеток БЦЖ. Вакцину ресуспендируют в 1,0 мл растворителя и вводят детям внутрикожно по 0,05 мл, т.е. прививочная доза содержит от 75000 до 300000 жизнеспособных клеток БЦЖ. В нашей стране в 80-х годах прошлого столетия была создана и внедрена в практику вакцина БЦЖ-М. Вакцина была

Таблица 2. Результаты определения протективных свойств туберкулезных вакцин в зависимости от количества жизнеспособных БЦЖ в дозе

№ группы	Препарат	Доза вакцины		Заражение	Количество животных с поражением лимфоузлов и внутренних органов			Индекс поражения
		мг	жизнеспособные клетки БЦЖ		Легкие	Средней тяжести	Тяжелые	
1	БЦЖ 368 «щ» (посевная серия)	0,01	400 тыс.	<i>M. tuberculosis</i> Erdman	12	6	0	12,75
2	БЦЖ-М сер. 732 (Москва)	0,005	115 тыс.		8	7	0	17,97
3	БЦЖ сер. 733 (Москва)	0,01	160 тыс.		12	6	0	12,05
4	БЦЖ сер. 733 (Москва)	0,005	80 тыс.		12	8	0	17,85
5	Контроль	0,1 мл	—		0	6	14	73,5

создана с целью снижения осложнений на вакцинацию БЦЖ в 1985 г. совместно предприятием Медгамал ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи и ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Препарат содержал в два раза меньшую по весу прививочную дозу при незначительном снижении количества жизнеспособных клеток БЦЖ [12]. Вакцина БЦЖ-М предназначалась для вакцинации новорожденных в регионах с низкой заболеваемостью туберкулезом, а также для детей, имеющих противопоказания к вакцинации БЦЖ. С 1990 г. показания к применению вакцины БЦЖ-М значительно расширены и она широко применяется в стране в регионах с заболеваемостью менее 80 на 100 тысяч. Постмаркетинговые исследования выявили, что снижение количества поствакцинальных осложнений на вакцину БЦЖ-М меньше, чем было показано при клинических исследованиях препарата. Кроме того установлено, около 30 % осложнений связаны с состоянием организма ребенка, около 30 % осложнений является результатом нарушения техники прививки и только 1/3 осложнений связаны с вакциной БЦЖ или БЦЖ-М [7, 13]. Тем не менее, задача уменьшить реактогенность прививочного препарата оставалась актуальной. Ее решение привело к снижению верхнего лимита жизнеспособных клеток в прививочной дозе. Как показали постмаркетинговые исследования, применение таких вакцин приводит к значительному снижению реактогенности препаратов и тем самым к снижению количества поствакцинальных осложнений [7]. Изменения в технологии приготовления препарата или его основных характеристик требует постоянного мониторинга его основных качеств. В рамках такого мониторинга проведено экспериментальное исследование протективных свойств туберкулезных вакцин. Это исследование вакцин БЦЖ/БЦЖ-М на чувствительной модели (морских свинок) является важным этапом изучения вакцинного препарата. Изучение протективных свойств 4 посевных серий, показало, что посевные серии, изготовленные для производства вакцин БЦЖ и БЦЖ-М в различные годы, обладают выраженной иммуногенностью. Протективные свойства используемой в настоящее время посевной серии 368 «щ» исследованы в одном эксперименте с сериями, в которых показатель жизнеспособности находится в пределах границ, сниженных в 2012 г. [8, 9]. Результаты изучения иммуногенности этих препаратов с достоверностью позволяют заключить, что снижение в рамках существующих требований верхнего лимита жизнеспособных клеток БЦЖ в вакцинах не повлияло на протективные свойства препаратов. Эти резуль-

таты подтверждают целесообразность дальнейшего применения усовершенствованных вакцин БЦЖ и БЦЖ-М в практике здравоохранения.

Литература

1. Аксенова ВА, Леви ДТ. Туберкулезные вакцины. В кн.: Зверев ВВ, Семенов БВ, Хаитов РМ, ред. Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. С. 371–411.
2. Behr MA. BCG-different strains, different vaccines? *Lancet Infect. Dis.* 2002; 2(2): 86–92.
3. Ritz N, Hanekom WA, Robins-Browne R, Britton WJ, Curtis N. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008; 32(5): 821–41.
4. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 745, and Amendment to Annex 12 of WHO Technical Report Series, No. 771. WHO Technical Report Series No. 979, 2013.
5. Ritz N, Dutta B, Donath S, Casalaz D, Connell TG, Tebruegge M, et al. The influence of bacille Calmette-Guérin vaccine Strain on the immune response against tuberculosis: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185: 213–22.
6. Аксенова ВА, Леви ДТ, Закирова НВ. Современные проблемы вакцинопрофилактики туберкулеза у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 1999; 44(1): 3–6.
7. Леви ДТ, Александрова НВ, Севостьянова ТА, Подлипавова ИВ, Аксенова ВА, Рухамина МЛ. Осложнения после вакцинации против туберкулеза. *Туберкулез и болезни легких* 2013; (9): 10–5.
8. Вакцина туберкулезная (БЦЖ), лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения 50 мкг/доза. Р N001969/01-310308, Изменения № 4 от 18.05.2012 филиал «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи».
9. Вакцина туберкулезная для щадящей первичной иммунизации (БЦЖ-М), лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения, 25 мкг/доза. Р N001972/01-300512, Изменения № 4 от 30.05.2012 филиал «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи».
10. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., Практика, 1998.
11. Safety update of BCG vaccine. WHO. *Weekly epidemiological record.* № 28, 2017, 92, 396–398.
12. Яблокова ТБ, Писаренко НН, Леви ДТ, Казачкова ТЕ, Нестеренко ЛА. Экспериментальное изучение вакцины БЦЖ-М — препарата с уменьшенной антигенной нагрузкой. *Пробл. туберкул.* 1985; (6): 52–62.
13. Леви ДТ, Александрова НВ. Вакцинопрофилактика туберкулеза. *БИОпрепараты, профилактика, диагностика, лечение* 2015; (2): 4–8.

Об авторах

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

Леви Диана Тимофеевна. Главный эксперт управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Александрова Наталья Владимировна. Главный эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Лебединская Елена Владимировна. Ведущий научный сотрудник отдела редакционно-издательской деятельности и защиты интеллектуальной собственности Центра планирования и координации НИР, канд. биол. наук.

Наконечная Алла Витальевна. Эксперт 2 категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Адрес для переписки: Леви Диана Тимофеевна; Levi@mail.ru

Experimental study of the protective effect of tuberculosis vaccines

D. T. Levy, N. V. Aleksandrova, E. V. Lebedinskaya, A. V. Nakonechnaya

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

The article presents the results of a retrospective analysis of experimental data on the protective properties of the three seed lots of tuberculosis vaccines which have been used in the production of BCG and BCG-M vaccines since 1984. It was shown that these seed lots have comparable characteristics of viability, which accounts for their equivalent immunogenicity. An additional study of the protective properties of the preparations was carried out in guinea pigs vaccinated with production batches of tuberculosis vaccines containing a different amount of viable BCG cells in the vaccine dose. Exposure of animals to a virulent strain of *M. tuberculosis* 2.5 months after the vaccination demonstrated high immunogenicity of the tuberculosis vaccines. It was established that a fivefold reduction in the dose of a vaccine with a high content of viable BCG cells only slightly reduces the degree of protection of the animals from disseminated tuberculosis. Thus, the data obtained confirmed that the 30 % reduction of the upper limit of the viability (viable BCG) of the BCG and BCG-M tuberculosis vaccines aimed at reducing their reactogenicity does not affect the protective properties of the preparation. It is important to note that previous post-marketing surveillance of such improved vaccines has shown a significant reduction in the number of post-vaccination complications in children.

Key words: BCG vaccine; complications; viability; immunogenicity; tuberculosis.

For citation: Levy DT, Aleksandrova NV, Lebedinskaya EV, Nakonechnaya AV. Experimental study of the protective effect of tuberculosis vaccines. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(4): 253–257.

References

1. Aksenova VA, Levi DT. Tuberculosis vaccines. In: Zverev VV, Semenov BF, Khaitov RM, eds. *Vaccines and vaccination. National guidance*. M.: GEOTAR-Media; 2011. P. 371–411 (in Russian).
2. Behr MA. BCG-different strains, different vaccines? *Lancet Infect. Dis.* 2002; 2 (2): 86–92.
3. Ritz N, Hanekom WA, Robins-Browne R, Britton WJ, Curtis N. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008; 32 (5): 821–41.
4. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 745, and Amendment to Annex 12 of WHO Technical Report Series, No. 771. WHO Technical Report Series No. 979, 2013.
5. Ritz N, Dutta B, Donath S, Casalaz D, Connell TG, Tebruegge M, et al. The influence of bacille Calmette-Guerin vaccine Strain on the immune response against tuberculosis: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185: 213–22.
6. Aksenova VA, Levi DT, Zakirova NR. Modern problems of vaccinoprophylaxis of tuberculosis in children. *Ros. vestn. perinatologii, pediatrii* 1999; 44 (1): 3–6 (in Russian).
7. Levi DT, Aleksandrova NV, Sevostyanova TA, Podlipaeva IV, Aksenova VA, Rukhamina ML. Complications after vaccination against tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases* 2013; (9): 10–5 (in Russian).
8. Tuberculosis vaccine (BCG), lyophilizate for the preparation of a suspension for intradermal administration of 50 µg/dose. P N001969/01–310308. Changes № 4 from 18.05.2012 the branch of «Medgamal» FGBU «FNIISEM im. N. F. Gamaleyi» (in Russian).
9. Tuberculosis vaccine for gentle primary immunization (BCG-M), lyophilizate for the preparation of a suspension for intradermal administration, 25 µg/dose. P N001972/01–300512. Changes № 4 from 30.05.2012 the branch of «Medgamal» FGBU «FNIISEM im. N. F. Gamaleyi» (in Russian).
10. Glants S. *Medical and biological statistics*. Moscow: Praktika, 1998 (in Russian).
11. Safety update of BCG vaccine. WHO. *Weekly epidemiological record* 2017; 92 (28): 396–8.
12. Yablokova TB, Pisarenko NN, Levy DT, Kazachkova TE, Nesterenko LA. Experimental study of BCG-M vaccine with a reduced antigen load. *Tuberculosis and Lung Diseases* 1985; (6): 52–62 (in Russian).
13. Levi DT, Aleksandrova NV. Vaccinations for the prevention of tuberculosis. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015; (2): 4–8 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Levi DT. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial MIBPs of the Centre for Evaluation and Control of MIBPs. Doctor of Medical Sciences, professor.

Aleksandrova NV. Chief expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of MIBPs' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Lebedinskaya EV. Leading researcher associate of the Department for Editorial and Publishing Activities and Intellectual Property Protection of the Centre for Planning and Coordination of Scientific Activities. Candidate of Biological Sciences.

Nakonechnaya AV. 2nd professional category expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of MIBPs' Quality.

Contact e-mail: Levi Diana Timofeevna; Levi@expmed.ru



**РАУЗА АСХАТОВНА
ВОЛКОВА**
(к 70-летию со дня рождения)

**RAUZA ASKHATOVNA
VOLKOVA**
(on the 70th anniversary)

9 ноября 2017 г. исполнилось 70 лет со дня рождения начальника лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов доктора биологических наук Раузы Асхатовны Волковой.

Р. А. Волкова в 1971 г. окончила МГУ им. М. В. Ломоносова, затем в 1974 г. — аспирантуру этого же университета на кафедре молекулярной биологии биологического факультета. В 1976 г. защитила кандидатскую диссертацию.

После окончания обучения Рауза Асхатовна начала свою трудовую деятельность в январе 1975 года в ГИСК им. Л. А. Тарасевича в лаборатории биохимии, где прошла путь от младшего научного сотрудника (1975–1981 гг.), старшего научного сотрудника (1981–1994 гг.) до заведующего этой же лабораторией (1994–2011 гг.).

В период работы в ГИСК им. Л. А. Тарасевича Р. А. Волкова обучалась методам контроля качества МИБП в США (1993 г.) и Великобритании (1999 г.).

Являясь высококвалифицированным специалистом по проблеме обеспечения качества МИБП, находящихся в обращении на территории Российской Федерации, Р. А. Волкова определяла перспективные направления методологии стандартизации биологических препаратов и курировала ведущие отечественные предприятия по производству МИБП.

Результаты научных исследований по совершенствованию физико-химических, иммунохимических и молеку-

лярно-биологических методов контроля качества МИБП легли в основу ее докторской диссертации, защищенной в 2009 г.

С 2011 года в связи с реорганизацией ГИСК им. Л. А. Тарасевича в форме присоединения к ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Р. А. Волкова возглавила лабораторию молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов.

В настоящее время Р. А. Волкова является одним из руководителей научного направления по разработке и совершенствованию отраслевых стандартных образцов, предназначенных для контроля качества иммунобиологических препаратов, является членом Совета Министерства здравоохранения Российской Федерации по Государственной фармакопее, членом редколлегии журнала «Стандартные образцы».

Р. А. Волкова лично и в соавторстве опубликовала более 100 научных трудов, является соавтором 2 патентов на изобретения и более 10 методических документов. Под ее руководством защищены 3 кандидатские диссертации.

За многолетний и добросовестный труд Р. А. Волкова награждена медалью «В память 850-летия Москвы» (1997 г.), нагрудным знаком «Отличник здравоохранения» (1999 г.), Почетной грамотой и Благодарностью Министра здравоохранения Российской Федерации (2012, 2017 гг.).