

На правах рукописи

ГОСТИЦЕВА СВЕТЛАНА ЕВГЕНЬЕВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА
И ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ ЖИВОЙ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск

2021

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

Куличенко Александр Николаевич, член-корреспондент Российской академии наук Российской Федерации, доктор медицинских наук (специальность 03.02.03 – микробиология), профессор, директор Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Официальные оппоненты:

Комиссаров Александр Владимирович, доктор биологических наук (специальность 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии), профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник, г. Саратов

Саяпина Лидия Васильевна, доктор медицинских наук (специальность 03.02.03 – микробиология), старший научный сотрудник, Управление экспертизы противобактериальных медицинских иммунобиологических препаратов Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный эксперт, г. Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Федерального агентства научных организаций, г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 г. в «__» часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора РФ по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, кор. №1, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора РФ

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Надежда Константиновна Фурсова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Чума – зоонозная природно-очаговая инфекция, которая относится к особо опасным инфекционным болезням. В настоящее время стабильное эпидемиологическое благополучие по чуме обеспечивается проведением комплекса профилактических мероприятий.

Вакцинация является самым эффективным способом борьбы с многими инфекционными заболеваниями, проводится в плановом порядке и по эпидпоказаниям (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 125н от 21.03.2014). С 2019 года все вакцинные препараты, применяемые на территории Российской Федерации в рамках Календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям, включены в число жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (Распоряжение Правительства Российской Федерации № 2406 от 12.11.2019).

В России для профилактики чумы применяется живая вакцина из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. В настоящее время она остается наиболее эффективным профилактическим противочумным препаратом и обладает способностью после однократной прививки относительно быстро индуцировать специфический иммунный ответ (Дальвадянц С.М., 2005; Кравцов А.Л., 2011; Williamson E.D., 2011; Amedei A., 2011).

Несмотря на то, что за многие годы выпуска этой вакцины технология ее изготовления хорошо отработана, актуальными задачами являются оптимизация условий выращивания штамма *Y. pestis* EV и совершенствование биотехнологии производства для улучшения качества биопрепарата по показателю жизнеспособности.

Степень разработанности темы исследования. Совершенствование биотехнологии производства вакцины чумной живой осуществлялось в разных направлениях: оптимизация температурных режимов культивирования (Иванова Г.Ф., 2007; Абзаева Н.В., 2010; Шаров Д.А., 2019), подбор стабилизаторов (Лопатина Н.В., 1994; Будыка Д.А., 1995), отработка режимов лиофилизации (Тинкер А.И., 1971; Дуняшева Т.Ю., 2010; Лопатин Н.В., 2018;

Абзаева Н.В., 2019; Kevin R., 2019), усовершенствование этапов технологического процесса (Ефременко А.А., 2005; Будыка Д.А., 2016; Абзаева Н.В., 2017; Лещенко А.А., 2020).

Для культивирования вакцинного штамма предлагались различные среды с использованием питательных основ из сырья растительного происхождения (Гюлушанян К.С., 1994; Старцева О.Л., 2005; Курилова А.А., 2009), мяса, рыбных продуктов, кровяных сгустков (Филиппов А.Ф., 1973; Шепелин А.П., 2013), казеина (Niguchi K., 1957; Муравьева Н.К., 1962), из ферментативного гидролизата белков коровьего молока (Лещенко А.А., 2011), дрожжей (Шамсудинова Б.М., 2003; Антонычева М.В., 2012). Однако в связи с высокой себестоимостью или нестандартностью ингредиентов остается востребованным поиск и апробация подходящего для этой цели стандартного и недорогого сырья. Совершенствование и конструирование новых питательных основ и сред, используемых в производстве, сохраняет свою актуальность.

Ряд авторов предлагали оптимизировать биотехнологию препарата с целью повышения жизнеспособности и стабилизации при хранении: снижение концентрации и объема суспензии в ампуле (Будыка Д.А., 2002; Ефременко А.А., 2005), получение вакцины с малым количеством доз, минуя этап сведения (Будыка Д.А., Абзаева Н.В., 2017), применение метода микрофльтрации для концентрации микробных клеток (Лещенко А.А., 2014; Шаров Д.А., 2020).

Иммунологическая активность – одна из основных характеристик вакцины, отражающая ее профилактическую эффективность. Ведущая роль в формировании противочумного иммунитета отводится клеточным факторам, а серологические реакции только косвенно могут указывать на наличие или отсутствие специфической резистентности организма к чуме.

В последние годы для оценки эффективности вакцинации применяют антиген-стимулированные клеточные тесты *in vitro* с использованием технологии проточно-цитометрического анализа (Щуковская Т.Н., 2007; Рыжикова С.Л., 2009; Хайдуков С.В., 2012; Богачева Н.В., 2013; Литвинова Л.С., 2014; Дерябин Н.П., 2016; Фирстова В.В., 2017; Корытов К.М., 2018).

Однако эти методические подходы пока не адаптированы для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета.

Таким образом, актуальность научных исследований по совершенствованию биотехнологии производства вакцины чумной и оценке эффективности вакцинации против чумы является очевидной.

Цель исследования – совершенствование биотехнологии производства вакцины чумной живой (на этапах получения биомассы) и оценки качества препарата по показателю специфической активности (иммуногенности).

Основные задачи исследования:

1. Разработать технологию приготовления и оценить эффективность питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС) для культивирования чумного микроба.

2. Изучить возможность применения питательной среды ГКЭС в производстве вакцины чумной живой.

3. Усовершенствовать биотехнологию производства вакцины чумной на этапе приготовления полуфабриката микробной взвеси с использованием «метода объединенного смыва» и изучить регламентированные показатели качества полученных серий препарата.

4. Изучить эффективность оценки поствакцинального иммунитета у вакцинированных против чумы по показателям антигенреактивности Т-лимфоцитов методом проточной цитофлуорометрии.

Научная новизна работы. Впервые разработана питательная среда на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, позволяющая при промышленном выпуске чумной вакцины обеспечить высокий выход биомассы вакцинного штамма EV и повысить показатель жизнеспособности готового продукта в среднем до $43,5 \pm 4,9$ % (патент РФ № 2626568 от 28.07.2017).

Впервые разработан и апробирован «метод объединенного смыва» в биотехнологии производственного процесса вакцины чумной живой на этапе приготовления полуфабриката, позволяющий создавать идентичные условия в

процессе синхронизации взвеси, что способствует повышению качества препарата по показателю жизнеспособности в 1,3 раза по сравнению с контролем ($34,6 \pm 4,3$ %).

Показана эффективность применения клеточного антигенспецифического теста *in vitro* (КАСТ) для определения количественных показателей напряженности противочумного иммунитета и возможность использования этого подхода для оценки качества чумной вакцины (патент РФ на изобретение № 2680697 от 25.02.2019, № 2725872 от 07.07.2020).

Теоретическая и практическая значимость работы. Сконструирована питательная среда для культивирования чумного микроба, отвечающая требованиям НД по биологическим и физико-химическим показателям. Показана возможность применения среды ГКЭС для масштабированного производства вакцины. Методика приготовления и рецептура сконструированной среды изложены в Промышленном регламенте (ПР) № 01897080-34-17 на производство Питательного агара для культивирования микроорганизмов (ГКЭС) (протокол № 6 от 20.09.17), Методических рекомендациях «Производство и контроль качества плотной питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта (сгущенного) для культивирования чумного микроба и выращивания биомассы вакцинного штамма *Y.pestis* EV» (протокол № 6 от 30.06.16), Технических условиях 9385-50-01897080-2017 на Питательный агар для культивирования микроорганизмов (ГКЭС) и Изменениях № 1 к ПР 01897080-09-16 на производство вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения и ингаляций (протокол № 6 от 20.09.17) утверждены директором института (учрежденческий уровень внедрения) и подано заявление о внесении изменений в регистрационное досье № 141757 (федеральный уровень внедрения).

Оптимизирована биотехнология производства препарата вакцины чумной путем объединения двух микробных взвесей в одну для создания идентичных условий синхронизации микробных клеток биомассы вакцинного штамма.

Полученные практические результаты внесены в форме Изменений № 1 в ПР производства вакцины (протокол № 6 от 20.09.17) утверждены директором института (учрежденческий уровень внедрения) и подано заявление о внесении изменений в регистрационное досье № 141757 (федеральный уровень внедрения).

Обоснована возможность применения метода КАСТ для контроля качества вакцины чумной живой по показателю иммуногенности. Разработаны МР «Лабораторная оценка иммуногенности вакцины чумной живой с использованием антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* и проточно-цитометрического анализа» (протокол № 6 от 26.12.17) и утверждены директором института (учрежденческий уровень внедрения).

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы выстроена, исходя из цели и задач исследования. В работе использовали следующие методы исследования: микробиологические, физико-химические, иммуноцитометрические, микроскопические, статистические.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Использование разработанной плотной питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного в производстве вакцины чумной живой позволяет увеличить выход биомассы, повысить показатель жизнеспособности, обеспечить снижение себестоимости продукции.

2. Усовершенствование биотехнологии приготовления полуфабриката микробной взвеси вакцинного штамма путем совмещения этапов смыва и сведения бакмассы в один прием («метод объединенного смыва») позволяет повысить качество вакцины по показателю жизнеспособности.

3. Для контроля качества противочумных вакцин по показателю иммуногенности возможно применение клеточного антиген-стимулированного теста *in vitro* и технологии цитометрического анализа. Данный метод позволяет оценить динамику интенсивности экспрессии маркеров ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации лимфоцитов и позволяет судить о формировании иммунного ответа у людей в различные сроки после вакцинации против чумы.

Степень достоверности и апробация результатов работы. В основу диссертационной работы положены исследования, проведенные в рамках плановых НИР: «Разработка технологии соево-глютеиновых питательных сред для применения в производстве вакцины чумной живой» (№ гос. регистрации 115022670069), «Экспериментальное обоснование совершенствования биотехнологии производства вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения и ингаляций» (№ гос. регистрации АААА-Б18-218091490014-1).

Материалы диссертации, представлены и обсуждены на II и III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2017, 2019); VI Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2019); X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Москва, 2018); XI съезде Всероссийской научно-практической конференции общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (Москва, 2017); Всероссийской научно-практической конференции «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями» (Н. Новгород, 2016); научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (Новосибирск, 2016); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2016); VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Москва, 2016); VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Санкт-Петербург, 2015).

Личное участие соискателя. Все экспериментальные данные, представленные в диссертационной работе, были получены либо лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, анализ и статистическую обработку данных, оформление и публикацию результатов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 24 научные работы, в том числе 3 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, получено в соавторстве 3 патента РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 173 источника, из них 55 – зарубежных. Работа изложена на 123 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 15 таблицами, 6 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований. В работе были использованы: вакцинный штамм чумного микроба *Y. pestis* EV линии НИИЭГ; вирулентный штамм чумного микроба *Y. pestis* 231.

Основные питательные среды: агар и бульон Хоттингера, приготовленные в соответствии с ТУ № 9385-004-01897080-2009, кукурузно-казеиновая питательная среда, среда высушивания (тиомочевинная) в соответствии с ПР 01897080-09-16, среда Сабуро, тиогликолевая среда в соответствии с ФСП 42-8654-07, получены из лаборатории питательных сред для культивирования микроорганизмов I-IV групп патогенности ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. При конструировании экспериментальной питательной среды использовали питательный агар на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного и ростостимулирующие добавки – соль Мора и натрий сернистокислый. Биологические показатели и физико-химические свойства гидролизатов и сред оценивали в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред», МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль

диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза».

В экспериментальные опыты брали аутбредных белых мышей массой 18-20 г, морских свинок массой 250-300 г, кроликов массой 1,5-2,5 кг.

Критерии качества препарата вакцины чумной живой определяли в соответствии с ФСП 42-8654-07. Оценку иммуногенности вакцины чумной живой осуществляли классическим методом и с применением метода КАСТ.

Для оценки поствакцинального противочумного иммунитета определяли экспрессию рецепторов (CD25, HLA-DR) на поверхности лимфоцитов при антигенспецифической стимуляции *in vitro*. В качестве специфического антигена использовали комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба, полученный по методу Е.Н. Афанасьева (1986).

Статистическую обработку проводили с использованием стандартных статистических программ, определяли среднее значение анализируемого показателя (M), ошибку средней арифметической (m). Достоверность уровня различий сравниваемых величин оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка питательной среды на основе кукурузного экстракта сгущенного

Для питательной основы в качестве сырья использовали кукурузный экстракт сгущенный – побочный продукт крахмально-паточного производства, который богат микроэлементами, аминокислотами, витаминами.

Технология приготовления ферментативного гидролизата из кукурузного экстракта сгущенного. За основу технологии изготовления взята общепринятая схема получения гидролизатов по Хоттингеру, включающая подготовку ферментного препарата, проведение непосредственно гидролиза и очистку полученной гидролизной массы путем фильтрации согласно ПР.

Кукурузный экстракт сгущенный из расчета 1 кг на 1,5 л дистиллированной воды кипятили 10 мин, охлаждали до 46 °С и проводили коррекцию рН до 8,2-8,4. В остуженный настой добавляли поджелудочную железу крупного рогатого скота из расчета 80-100 г на 1,0 л и в качестве консерванта – хлороформ (1,5 %). Гидролиз проводили при температуре (37±2) °С, ежедневно измеряя уровень аминного азота. После прекращения нарастания аминного азота (на 7-10 сут) гидролизат отстаивали при температуре (20±2) °С в течение 2 сут, затем отфильтровывали, разливали по бутылкам, добавляя хлороформа (1,0 %) и хранили при температуре (4±2) °С.

Приготовление питательной среды ГКЭС, из расчёта на 1 л среды:

гидролизат кукурузного экстракта сгущенного	– 48,0 мл
натрия хлорид	– 5,0 г
натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный	– 4,0 г
натрий сернистоокислый	– 0,3 г
соль Мора	– 0,1 г
агар микробиологический	– 17,0 г
дистиллированная вода	– до 1 литра

Среду кипятили до полного растворения ингредиентов и остужали до 56 °С. Затем вносили стимуляторы (натрий сернистоокислый, соль Мора) и устанавливали рН 7,2±0,1. Разливали во флаконы или матрацы, стерилизовали при (120±1) °С, 0,5 атм в течение 30 мин, охлаждали и затем выдерживали при температуре (37±2) °С в течение 48 ч для контроля стерильности.

В ходе эксперимента аналогично готовили вариант плотной питательной среды без добавления стимуляторов. Жидкий вариант питательной среды готовили также, но без добавления агара (со стимуляторами и без них).

Каждую серию сред (6 серий: 3 – со стимуляторами роста; 3 – без стимуляторов), контролировали в трехкратном повторе по физико-химическим и биологическим показателям согласно МУК 4.2.2316-08 и МУ 3.3.2.2124-06.

Результаты исследований показали, что по физико-химическим и биологическим свойствам среда ГКЭС полноценна по компонентному составу, характеризуется простой технологией изготовления, малым числом

компонентов и эффективна при культивировании вакцинного штамма *Y.pestis*, что обеспечивает оптимальные условия для его выращивания.

Сравнительная характеристика вакцинного препарата, полученного на питательных средах из различного сырья

В ПР на производство вакцины чумной для накопления биомассы предусмотрено применение двух сред: агар Хоттингера и кукурузно-казеиновый агар. В связи с этим изучены физико-химические показатели разработанной экспериментальной питательной среды в сравнении с регламентированными средами (Таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительный анализ свойств питательных сред для культивирования *Y. pestis* EV

Основные показатели	Питательные среды		
	Кукурузно-казеиновый агар	Агар Хоттингера	Питательный агар (ГКЭС)
Основа питательной среды	Ферментативные гидролизаты кукурузного экстракта и казеина (1:2)	Ферментативный гидролизат говяжьего мяса	Ферментативный гидролизат кукурузного экстракта сгущенного
рН в среде	7,1±0,1	7,1±0,1	7,1±0,1
Аминный азот в питательной среде, %	0,119±0,040	0,120±0,010	0,124±0,050
Сухой остаток в питательной среде, %	4,0±0,5	4,3±0,5	4,3±0,6
Хлориды (в пересчете на натрия хлорид), %	0,6±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1
Прочность геля, г	350,0±10,0	350,0±25,0	360,0±20,0
Температура плавления, °С	85,0±2,0	85,0±2,0	85,0±2,0
Температура застудневания, °С	35,0±0,5	35,0±0,5	36,0±0,5
Продолжительность плавления, мин	53,0±2,0	55,0±2,0	52,0±5,0

При сравнительном изучении по физико-химическим показателям сконструированная питательная среда ГКЭС равноценна классическим средам.

Изучены регламентированные показатели качества полученных 18 серий препарата: 6 – с выращиванием на питательном агаре Хоттингера, 4 – на кукурузно-казеиновом агаре и 8 – на агаре ГКЭС (Таблица 2).

Выявлено, что показатель жизнеспособности серий вакцины, приготовленной на агаре ГКЭС, в 1,3 раза выше, чем у серий, полученных на

регламентированных питательных средах ($p \leq 0,05$). Повышение показателя термостабильности говорит об оптимально подобранной питательной среде, которая способствует сохранению живых м.к. при хранении препарата.

Таблица 2 – Сравнительная оценка вакцины чумной живой, полученной при использовании изучаемых питательных сред

Основные показатели	Регламентированные параметры	Питательные среды		
		Агар Хоттингера	Кукурузно-казеиновый агар	Питательный агар (ГКЭС)
Оптическая концентрация, млрд/мл	50-100	80±1,5	80±2,1	100±1,9
Жизнеспособность, %	не менее 25,0	38,1±2,3	36,3±2,2	46,2±0,9
Термостабильность, сут	не менее 4,0	6,8±0,4	7,4±0,7	13,5±0,8
Себестоимость среды (1 л), руб	-	875	580	250

Кукурузный экстракт сгущенный – это побочный продукт крахмально-паточного производства, стоимость этой питательной среды меньше, чем стоимость агара Хоттингера в 3,5 раза, кукурузно-казеинового агара – в 2,3 раза. Таким образом, использование питательной среды ГКЭС позволит повысить качество и снизить себестоимость конечной продукции.

Апробация питательной среды ГКЭС для масштабированного производства вакцины чумной живой

Питательная среда ГКЭС апробирована как накопительная для выращивания вакцинного штамма чумного микроба аппаратным методом (АКМ-Ш). В ходе эксперимента было получено 8 серий препарата. Контроль вакцины осуществляли на всех этапах ее изготовления в соответствии с НД.

Питательная среда считается пригодной для производства при показателе эффективности не менее 4 млрд. м.к. с 1 мл среды. Среднее количество бакмассы, полученной с 1 мл среды, составило 4,7±0,3 млрд. м.к./мл. Таким образом, питательная среда ГКЭС обеспечивает высокий уровень роста биомассы вакцинного штамма.

Жизнеспособность вакцины составила в среднем 43,5±4,9 %. Величина термостабильности соответствовала регламентированным нормам от 10 до 15 сут. Все остальные показатели также соответствовали НД.

Таким образом, использование питательной среды ГКЭС при промышленном выпуске вакцины чумной живой обеспечивает высокий выход бактериальной массы и позволяет повысить жизнеспособность готового препарата.

Совершенствование этапа приготовления вакцинной взвеси

В соответствии с ПР смыв микробной массы с АКМ-Ш проводят средой высушивания последовательно в две емкости (по 5,0 л). Полученные суспензии значительно отличаются по показателям концентрации и по соотношению: количество микробных клеток/компоненты стабилизатора, количество микробных клеток/продукты метаболизма.

С целью повышения жизнеспособности м.к. в вакцинной суспензии наши исследования были направлены на создание идентичных условий в процессе синхронизации биомассы (выдерживание при температуре (4 ± 2) °С 48 ч, для накопления клеток, находящихся в стационарной фазе роста), путем объединения двух микробных взвесей в одну непосредственно после смыва.

«Методом объединенного смыва» в течение трех технологических циклов изготовлены пять экспериментальных серий, которые исследованы по основным регламентированным показателям. Четыре контрольные серии, полученные традиционным методом, исследованы по тем же параметрам.

Все полученные серии соответствовали регламентированным нормам (оптическая концентрация, жизнеспособность, термостабильность, потеря в массе при высушивании). При этом показатель жизнеспособности в экспериментальных сериях вакцины, полученных «методом объединенного смыва», был достоверно выше ($45,9\pm 3,6$ %) по сравнению с контрольными сериями ($34,6\pm 4,3$ %) ($p\leq 0,05$).

Таким образом, усовершенствование биотехнологии приготовления микробной взвеси вакцинного штамма путем совмещения смыва и сведения бакмассы в один прием позволяет улучшить качество конечного продукта по показателю жизнеспособности.

Оценка стабильности экспериментальных серий препарата вакцины чумной живой в течение срока годности

Срок годности лекарственного препарата вакцины чумной живой составляет три года при хранении и транспортировке в условиях «холодовой цепи». Для изучения стабильности препарата, полученного «методом объединенного смыва», проведен мониторинг жизнеспособности экспериментальных и контрольных серий через различные промежутки времени его хранения.

При сравнительном анализе показатель жизнеспособности экспериментальных серий на дату выпуска составлял $45,9 \pm 3,3$ %, контрольных – $34,6 \pm 3,7$ %, через год хранения у экспериментальных серий – $43,3 \pm 3,1$ %, контрольных – $31,4 \pm 3,7$ %, через 2 года – $43,1 \pm 3,3$ %, $30,5 \pm 3,6$ и через 3 года показатель снизился до $40,9 \pm 3,4$ % и $28,3 \pm 3,6$ соответственно.

Через три года хранения вакцины, полученной «методом объединенного смыва», показатель жизнеспособности снизился в среднем на 5,0 %, в контроле на 6,3 % (различия статистически не значимы $p \leq 0,05$).

Это доказывает, что препарат, полученный данным методом, стабилен при длительных сроках хранения, что подтверждает целесообразность использования данной методики в промышленном производстве препарата.

Оценка клеточного звена иммунитета у лабораторных животных вакцинированных чумной вакциной с использованием метода КАСТ

Контроль качества производственных серий вакцины проводится в соответствии с НД и предписывает проведение иммунизации и последующее заражение лабораторных животных. Недостатком регламентированного метода оценки иммуногенности является длительное (21 день) содержание зараженных возбудителем чумы животных и связанная с этим потенциальная опасность работ с вирулентным штаммом чумного микроба.

Изучена возможность применения антигенспецифического клеточного теста *in vitro* для контроля иммуногенной активности препарата.

В качестве биомодели использованы белые лабораторные мыши: 4 группы по 30 особей, иммунизированных подкожно коммерческим препаратом вакцина

чумная живая в дозах – 8×10^2 , 4×10^3 , 2×10^4 и 1×10^5 живых м.к. Взятие крови осуществляли до вакцинации, на 7, 14, и 21 сут после иммунизации.

Следует отметить, что на 7, 14 и 21 сут у животных, иммунизированных в дозе 8×10^2 живых м.к., содержание лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD25, после стимуляции клеток специфическим антигеном оставалось на уровне контрольных значений.

У животных, вакцинированных дозами 4×10^3 , 2×10^4 и 1×10^5 живых м.к., наивысший уровень экспрессии лимфоцитами маркера активации (CD25) при антигенной стимуляции *in vitro* регистрировался на 14 сут после вакцинации (Рисунок 1). При иммунизации самой высокой дозой 1×10^5 живых м.к. увеличение количества лимфоцитов, в условиях стимуляции ВpАг, составило на 7, 14 и 21 сут: $12,09 \pm 1,20$ %; $56,88 \pm 5,84$ % и $24,91 \pm 2,23$ % соответственно, что статистически значимо выше контрольного значения ($4,33 \pm 0,51$) ($p \leq 0,05$).

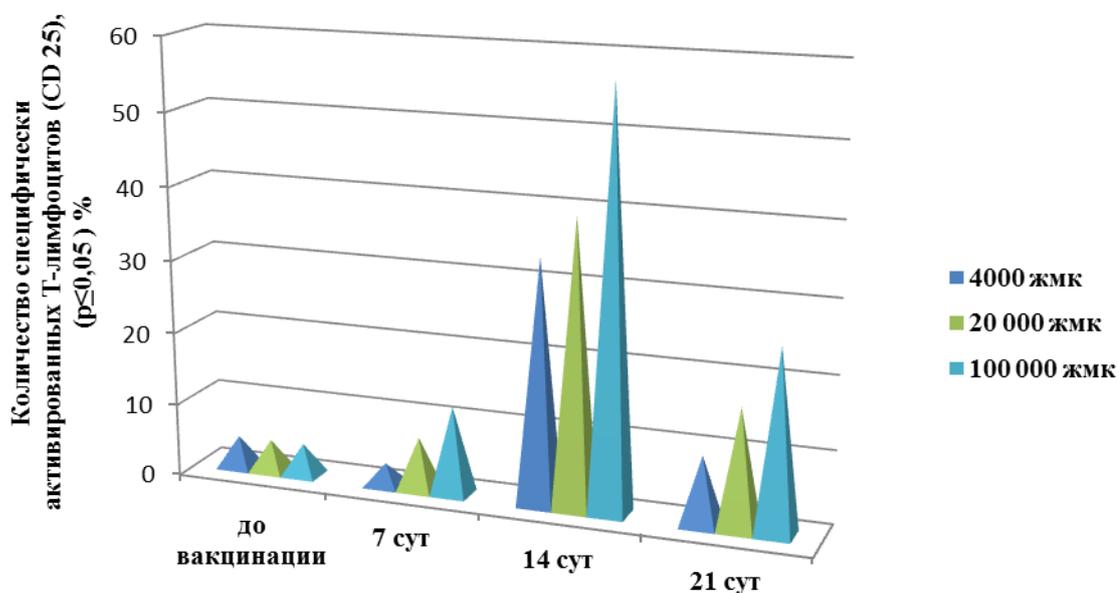


Рисунок 1 – Динамика количества специфически активированных лимфоцитов (CD25-позитивных) в крови у животных из групп сравнения

На 21 сут после иммунизации для подтверждения напряженности иммунитета животных каждой группы заражали подкожно 200 Dс1 вирулентного штамма *Y. pestis* 231. При сравнении количества выживших в опыте животных с повышением уровня лимфоцитов, экспрессирующих

антигенспецифические рецепторы CD25 установлена высокая степень прямой связи (коэффициент ранговой корреляции $r = 1,000$). Выявлено, что интенсивность антигенреактивности лимфоцитов четко коррелирует с иммунизирующей дозой.

В целом, продемонстрирована перспектива применения метода КАСТ с детекцией CD25 на активированных лимфоцитах для оценки формирования иммунного ответа при вакцинации против чумы.

Изучение возможности использования метода КАСТ для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета у людей

Обследуемый контингент подлежал ежегодной иммунизации против чумы по эпидемическим показаниям. Взятие крови осуществляли до вакцинации, через 7, 21 сут, 3, 6, 9 и 12 мес после иммунизации. Всего исследовано 210 образцов крови. Интенсивность антигенреактивности лимфоцитов выявляли в клеточных тестах *in vitro*, анализируя маркеры ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации лимфоцитов.

При активации клеток антигеном ВрАг на 7 сут отмечалось статистически достоверное повышение количества специфически активированных лимфоцитов (CD25) до $19,39 \pm 2,19$ %. А к 21 сут исследуемый показатель имел двукратное увеличение по сравнению со значением до вакцинации, составив в среднем $27,92 \pm 1,82$ % ($p \leq 0,05$) (рис. 2).

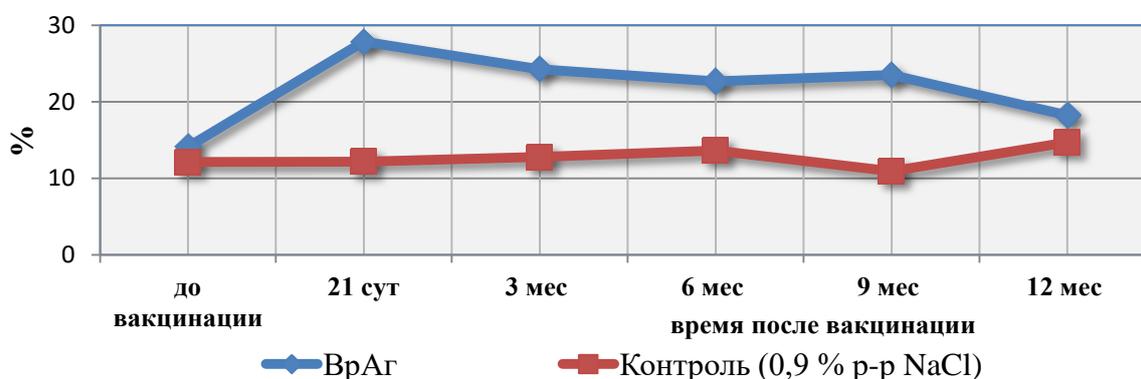


Рисунок 2 – Количество специфически активированных Т-лимфоцитов (CD25)

В последующие сроки после введения вакцины наблюдалась тенденция к снижению количества CD25-позитивных лимфоцитов, составив в среднем через 3 мес до $24,30 \pm 1,88$ % (контроль $12,78 \pm 1,10$ %), через 6 мес – $22,72 \pm 2,75$ % (контроль $13,64 \pm 1,72$ %), 9 мес – $23,52 \pm 1,65$ % (контроль $10,95 \pm 0,87$ %) и 12 мес – $18,28 \pm 2,68$ % (контроль $14,72 \pm 1,49$ %) при достоверной разнице с контрольными значениями ($p \leq 0,05$).

Как известно, HLA-DR-позитивные лимфоциты длительно циркулируют в кровотоке, отражая активированное состояние иммунной системы. Интенсивность экспрессии HLA-DR лимфоцитов специфическим антигеном у обследуемых до вакцинации составляла – $23,02 \pm 2,48$ % (контроль – $22,44 \pm 2,31$ %). На 7, 21 сут и через 3 мес после вакцинации, не выявлено разницы в значениях в сравнении с контролем.

Однако через 6 мес после иммунизации установлено достоверное повышение интенсивности экспрессии антигена DR, составившее в среднем $26,45 \pm 2,71$ % (контроль – $16,50 \pm 1,63$ %) ($p < 0,05$). Через 9 мес количество лимфоцитов в среднем составило – $23,52 \pm 1,65$ % (контроль – $17,62 \pm 1,67$ %), а к 12 мес показатель снизился до $13,82 \pm 0,88$ % (контроль – $13,86 \pm 0,77$ %) (рис.3).

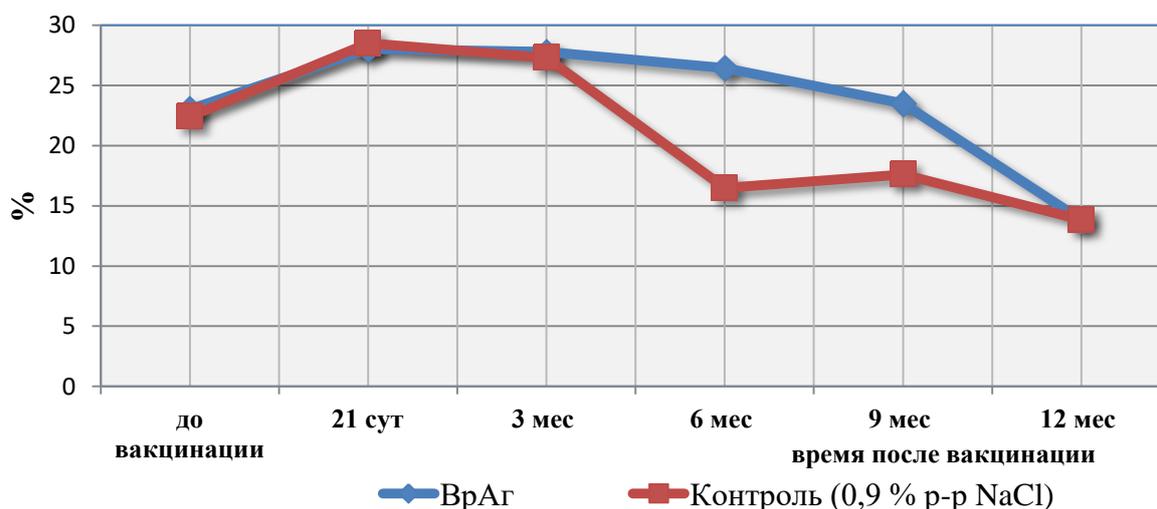


Рисунок 3 – Количество специфически активированных Т-лимфоцитов (HLA-DR)

Очевидно, что формирование иммунитета на введение противочумной вакцины первоначально обусловлено повышением количества лимфоцитов,

экспрессирующих маркеры ранней активации CD25, при этом максимум подъема приходится на 21 сут. Через 3 мес наблюдается повышение количества клеток HLA-DR (поздняя активация) при одновременном снижении CD25, что свидетельствует о дальнейшем формировании адаптивного иммунного ответа.

Проведенные исследования показали возможность применения данного методического подхода для лабораторной оценки формирования поствакцинального иммунитета у вакцинированных на ранних (21 сут) и поздних (6-9 мес) сроках после иммунизации.

В перспективе предложенный подход можно использовать в качестве дополнительного контрольного теста при изучении степени иммуногенности новых (кандидатных) вакцин против чумы в сравнении с зарегистрированными препаратами. Полученные результаты служат основанием для разработки нового метода количественной оценки иммунологической эффективности вакцинации против чумы, основанного на выявлении маркеров активации лимфоцитов при стимуляции специфическим антигеном.

ВЫВОДЫ

1. Сконструирована питательная среда на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного для культивирования микроба чумы, которая характеризуется простой рецептурой приготовления и меньшей в 2,9 раза себестоимостью по сравнению с регламентированными средами (агар Хоттингера и кукурузно-казеиновый агар, включенные в ПР на производство вакцины чумной живой).

2. Разработанная питательная среда включена в действующий регламент на производство вакцины чумной живой (ПР 01897080-09-16). Использование в биотехнологии производства вакцины чумной питательной среды ГКЭС позволяет обеспечить выход биомассы вакцинного штамма *Y. pestis* EV – в среднем $4,7 \pm 0,3$ млрд. м.к./мл. при необходимом уровне не менее 4,0 млрд. м.к./мл. и повысить показатель жизнеспособности готового препарата до $43,5 \pm 4,9$ % живых м.к. при необходимом уровне не менее 25,0 % живых м.к.

3. Разработан и включен в Промышленный регламент на производство вакцины чумной «метод объединенного смыва» на этапе синхронизации биомассы, который позволяет получить препарат с увеличенным показателем жизнеспособности: $45,9 \pm 3,6$ % живых м.к., что в 1,3 раза больше чем в контроле ($34,6 \pm 4,3$ %). Отмечена тенденция к увеличению стабильности (жизнеспособности) в течение срока годности, что подтверждает целесообразность использования данной методики в промышленном производстве препарата.

4. Применение антигенспецифического клеточного теста *in vitro* (КАСТ) может использоваться в качестве метода оценки специфической активности вакцины чумной живой по критерию иммуногенности. В эксперименте на биомоделях показано увеличение экспрессии маркера ранней активации CD25 под действием комплекса водорастворимых антигенов *Y. pestis* EV на поверхности Т-лимфоцитов что свидетельствует о формировании клеточного иммунного ответа.

5. Методический подход КАСТ позволяет оценить динамику интенсивности экспрессии маркеров ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации лимфоцитов у вакцинированных людей. Формирование противочумного иммунитета первоначально обусловлено повышением количества лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации CD25, при этом максимум подъема приходится на 21 сут – до $27,92 \pm 1,82$ % (контроль $12,18 \pm 1,38$ %). Через 6 мес наблюдается повышение количества клеток HLA-DR – $23,45 \pm 2,71$ % (контроль – $16,50 \pm 1,63$ %) ($p \leq 0,05$), что дает возможность судить о формировании иммунного ответа в различные сроки после вакцинации против чумы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется использовать в производстве вакцины чумной живой сконструированную питательную среду ГКЭС, что позволит обеспечить высокий выход биомассы вакцинного штамма и повышение показателя жизнеспособности готового продукта.

2. Для сохранения стабильности регламентированных показателей препарата в течение всего срока годности можно рекомендовать использование «метода объединенного смыва».

3. Применение клеточного антигенспецифического теста *in vitro* и технологии цитометрического анализа можно рекомендовать в качестве дополнительного контрольного теста при изучении степени иммуногенности новых (кандидатных) вакцин против чумы в сравнении с зарегистрированными препаратами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных изданиях, рекомендованных ВАК

1. Куличенко, А.Н. Использование антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета / А.Н. Куличенко, Н.В. Абзаева, С.Е. Гостищева, Е.Л. Ракитина, Д.Г. Пономаренко, М.В. Костюченко // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 7, № 2. – С. 203-208. (РИНЦ, Scopus, IF= 1,019; 11 цитирований)

2. Гостищева, С.Е. Оптимизация метода получения пестина ПП и изучение его специфической активности *in vitro* / С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Ю.В. Сирица, Е.Л. Ракитина, Е.Н. Афанасьев, М.В. Костюченко // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8, № 1. – С. 85-90. (РИНЦ, Scopus, IF= 1,019; 1 цитирование)

3. Гостищева, С.Е. Мониторинг стабильности вакцины чумной живой, приготовленной с использованием питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного / С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Г.Ф. Иванова, Л.С. Катунина, Д.В. Ростовцева, А.В. Костроминов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 4. – С. 37-40. (РИНЦ, Scopus, IF= 0, 617)

Патенты на изобретение

4. Патент RU № 2626568 Российская Федерация. Питательная среда плотная для культивирования и сбора биомассы чумного микроба вакцинного штамма *Y. pestis* EV / Катунина Л.С., Куличенко А.Н., Курилова А.А., Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ковтун Ю.С., Коготкова О.И. (RU); опуб.28.07.2017. – Бюл. № 22. – 8 с.

5. Патент RU № 2680697 Российская Федерация. Способ оценки иммуногенности вакцины чумной живой с использованием антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* / Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Логвиненко О.В., Катунина Л.С., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Курчева С.А., Куличенко А.Н. (RU); опуб.19.02.2019. – Бюл. № 6. – 8 с.

6. Патент RU № 2725872 Российская Федерация. Способ применения комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба для оценки уровня противочумного иммунитета / Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Логвиненко О.В., Пономаренко Д.Г., Катунина Л.С., Тюменцева

И.С., Афанасьев Е.Н., Курчева С.А., Куличенко А.Н. (RU); опуб.07.07.2020. – Бюл. № 19. – 6 с.

Публикации в других научных изданиях

7. **Гостищева, С.Е.** Оценка иммунно-аллергической перестройки организма при формировании поствакцинального иммунитета против чумы с помощью антиген-стимулированных тестов *in vitro* / С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Д.Г. Пономаренко, Е.Л. Ракитина, М.В. Костюченко, Л.С. Катунина // Научный альманах. – 2016. – № 7-2 (21). – С. 47-50.

8. **Гостищева, С.Е.** Применение плотной питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного в производстве вакцины чумной живой и для хранения штаммов чумного микроба / С.Е. Гостищева, Л.С. Катунина, А.А. Курилова, Н.В. Абзаева, Ю.С. Ковтун, Н.В. Жаринова, О.А. Коняева, Е.Б. Жилченко, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 1. – С. 75-78. (РИНЦ, IF= 0,617; 1 цитирование)

9. **Гостищева, С.Е.** Оценка качества вакцины чумной живой с использованием питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного / С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Г.Ф. Иванова, Д.В. Ростовцева, Л.С. Катунина, А.А. Зуенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 3. – С. 46-49. (РИНЦ, IF= 0,617; 3 цитирования)

10. **Гостищева, С.Е.** Использование плотной питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного для контроля качества препарата вакцины чумной живой / С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Д.В. Ростовцева, Г.Ф. Иванова // Научный альманах. – 2018. – № 3-2 (41). – С. 187-189.

11. **Гостищева, С.Е.** Перспективный подход к оценке качества вакцины чумной живой по показателю иммуногенности / С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Е.Л. Ракитина, Д.Г. Пономаренко, М.В. Костюченко, О.В. Логвиненко, А.Н. Куличенко // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 50-54. (РИНЦ, IF= 0,845; 1 цитирование)

Тезисы докладов в сборниках научных трудов конференций

12. **Гостищева, С.Е.** Динамика показателей лимфоцитов в процессе формирования иммунного ответа на введение белым мышам экспериментальной чумной вакцины / С.Е. Гостищева, Д.А. Будыка, Е.Л. Ракитина, Н.В. Абзаева, А.А. Фисун, Г.Ф. Иванова // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: материалы VII Всероссийской науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, г. Санкт-Петербург, 8-10 декабря 2015 г. – СПб., 2015. – С. 115.

13. Катунина, Л.С. Технологические аспекты приготовления живой чумной вакцины / Л.С. Катунина, А.А. Курилова, Ю.С. Ковтун, Е.И. Василенко, Д.А. Будыка, Н.В. Абзаева, **С.Е. Гостищева** // Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями: матер. Всероссийской науч.-практ. конф., г. Нижний Новгород, 25 мая 2016 г. – Н. Новгород: Растр-НН, 2016. – С. 164-166.

14. **Гостищева, С.Е.** Совершенствование биотехнологии чумной вакцины на этапе синхронизации / С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Д.А. Будыка, Г.Ф. Иванова, А.А. Зуенко // Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе: матер. науч.-практ. конф., г. Новосибирск, 26-27 сентября 2016 г. – Новосибирск. – 2016. – С. 187-188.

15. Ракитина, Е.Л. Изучение возможности использования антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета / Е.Л. Ракитина, С.Е. Гостищева,

Н.В. Абзаева, Д.Г. Пономаренко, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, М.В. Костюченко, Г.Ф. Иванова, Ю.Ю. Гаркуша // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания: матер. III Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, г. Сочи, 1-4 ноября 2016 г. – Сочи, 2016. – С. 229-232.

16. **Гостищева, С.Е.** Стандартизация препарата вакцины чумной живой путем совершенствования некоторых этапов биотехнологии / С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, А.А. Зуенко, Г.Ф. Иванова, Т.М. Гридина, Д.В. Ростовцева // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: матер. VIII Всеросс. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, г. Москва, 1-3 ноября 2016 г. – М.: Грифон, 2016. – С. 60-61.

17. Абзаева, Н.В. Оценка противочумного иммунитета в поздние сроки после вакцинации / Н.В. Абзаева, **С.Е. Гостищева**, Е.Л. Ракитина, Д.Г. Пономаренко, М.В. Костюченко, Г.Ф. Иванова, С.А. Курчева, К.А. Савченко // Материалы II Всероссийской науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных», г. Ставрополь, 5-6 апреля 2017 г. – Ставрополь, 2017. – С. 288-289.

18. **Гостищева, С.Е.** Сравнительный анализ иммуногенной активности экспериментальных и коммерческих серий вакцины чумной живой / С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, А.А. Зуенко, Г.Ф. Иванова, Д.В. Ростовцева // Материалы II Всероссийской науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных», г. Ставрополь, 5-6 апреля 2017 г. – Ставрополь, 2017. – С. 298-299.

19. Сирица, Ю.В. Оценка показателей качества экспериментального препарата пестина ПП с использованием спектрофотометрии и хроматографии / Ю.В. Сирица, Д.А. Ковалев, А.М. Жиров, **С.Е. Гостищева**, Н.В. Абзаева // Материалы II Всероссийской науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных», г. Ставрополь, 5-6 апреля 2017 г. – Ставрополь, 2017. – С. 269-271.

20. Абзаева, Н.В. Стабилизация показателя жизнеспособности чумной вакцины путем усовершенствования биотехнологических этапов производства / Н.В. Абзаева, **С.Е. Гостищева**, Г.Ф. Иванова, Д.В. Ростовцева // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения: матер. XI съезда Всеросс. науч.-практ. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, г. Москва, 16-17 ноября 2017 г. // под ред. А.Ю. Поповой. –СПб.: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 2017. – С. 114.

21. **Гостищева, С.Е.** Использование питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта в производстве вакцины чумной живой / С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Л.С. Катунина, А.А. Курилова, Г.Ф. Иванова, Д.В. Ростовцева // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения: матер. XI съезда Всеросс. науч.-практ. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, г. Москва, 16-17 ноября 2017 г. // под ред. А.Ю. Поповой. – СПб.: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 2017. – С. 425.

22. **Гостищева, С.Е.** Возможность использования комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба при оценке формирования поствакцинального противочумного иммунитета / С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Е.Л. Ракитина, Д.Г. Пономаренко, Ю.В. Сирица, Д.А. Ковалев, М.В. Костюченко // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: матер. X Всероссийской науч.-

практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, г. Москва, 24-26 октября 2018 г. – М.: Русский Печатный Двор, 2018. – С. 157-159.

23. Сирица, Д.А. Оценка показателей качества экспериментальных серий препаратов пестина ПП и комплекса водорастворимых антигенов *Yersinia pestis* EV / Ю.В. Сирица, Д.А. Ковалев, С.Е. Гостищева, С.А. Курчева, А.М. Жиров, Н.В. Абзаева // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: матер. X Всероссийской науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, г. Москва, 24-26 октября 2018 г. – М.: Русский Печатный Двор, 2018. – С. 272-274.

24. Гостищева, С.Е. Определение диагностически информативных показателей специфического иммунитета / Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Пономаренко Д.Г. // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: матер. III Всеросс. науч.-практ. конф. с международным участием 24-25 апреля 2019 г. // под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь: Экспо-Медиа, 2019. – С. 209-210.

25. Абзаева, Н.В. Повышение жизнеспособности чумной вакцины путем оптимизации некоторых технологических этапов / Н.В. Абзаева, Г.Ф. Иванова С.Е. Гостищева, Д.В. Ростовцева, А.В. Костроминов // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: матер. III Всеросс. науч.-практ. конф. с международным участием 24-25 апреля 2019 г. // под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь: Экспо-Медиа, 2019. – С. 255-256.

26. Абзаева, Н.В. Иммуногенная активность вакцины чумной живой, изготовленной на экспериментальной питательной среде / Н.В. Абзаева, С.Е. Гостищева, Е.Л. Ракитина, М.В. Костюченко, Д.Г. Пономаренко // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания: VI Всероссийской междисциплинарной научно-практ. конф. с международным участием, г. Сочи, 30 октября – 2 ноября 2019 г. - Краснодар: Новация, 2019. – С. 3-4.

27. Гостищева, С.Е. Анализ стабильности препарата вакцины чумной живой, изготовленного с использованием экспериментальной питательной среды / С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Г.Ф. Иванова, Л.С. Катунина, Д.В. Ростовцева // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания: VI Всероссийской междисциплинарной научно-практ. конф. с международным участием, г. Сочи, 30 окт. – 2 ноября 2019 г. – Краснодар: Новация, 2019. – С. 68-69.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГКЭС	- гидролизат кукурузного экстракта сгущенного
ВрАг	- комплекс водорастворимых антигенов <i>Y. pestis</i> EV
живые м.к.	- живые микробные клетки
НД	- нормативная документация
ПР	- промышленный регламент
ТУ	- технические условия
ФСП	- фармакопейная статья предприятия