

Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

На правах рукописи

Гостищева Светлана Евгеньевна

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

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Куличенко Александр Николаевич

Ставрополь - 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Пути совершенствования биотехнологии производства вакцины чумной живой.....	14
1.2 Формирование иммунного ответа на вакцинацию против чумы, методы определения противочумного иммунитета.....	22
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	30
2.1 Объекты исследования.....	30
2.1.1 Характеристика вакцинных противочумных препаратов и вирулентных культур.....	30
2.1.2 Реактивы, сырье.....	30
2.1.3 Питательные среды.....	32
2.1.4 Лабораторные животные	32
2.1.5 Оборудование.....	33
2.1.6 Критерии качества вакцины чумной живой.....	34
2.2 Методы исследования.....	36
2.2.1 Изучение физико-химических свойств гидролизатов и питательных сред.....	36
2.2.2 Оценка биологических показателей питательных основ и сред.....	36
2.2.3 Оценка биологических показателей питательных сред в отношении вакцинного штамма <i>Y.pestis</i> EV.....	36
2.2.4 Контроль стерильности питательных сред	37
2.2.5 Изучение показателя эффективности питательных сред	37
2.2.6 Определение жизнеспособности микробных клеток в вакцине.....	38
2.2.7 Подготовка вирулентного штамма.....	39
2.2.8 Определение иммуногенности вакцины.....	39
2.2.9 Определение пирогенности.....	40
2.2.10 Определение специфической безопасности.....	41
2.2.11 Определение потери в массе при высушивании	41

2.2.12	Определение термостабильности	41
2.2.13	Оценка иммуногенности вакцины чумной живой с использованием антигенспецифических клеточных тестов <i>in vitro</i> на белых мышах.....	42
2.2.14	Определение экспрессии рецепторов (CD25, HLA-DR) на поверхности лимфоцитов при антигенспецифической стимуляции <i>in vitro</i> ...	43
2.2.15	Статистические методы.....	44
ГЛАВА 3 Оценка эффективности применения питательной среды из ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС) для культивирования вакцинного штамма чумного микроба.....		
3.1	Разработка питательной среды на основе кукурузного экстракта сгущенного.....	47
3.2	Сравнительная характеристика вакцинного препарата, полученного на питательных средах из различного сырья.....	51
3.3	Апробация питательной среды ГКЭС для масштабированного производства вакцины чумной живой.....	53
ГЛАВА 4 Оптимизация технологии приготовления полуфабриката микробной взвеси вакцинного штамма с целью повышения жизнеспособности вакцины чумной живой.....		
4.1	Совершенствование этапа приготовления вакцинной взвеси.....	59
4.2	Анализ показателей качества полученного препарата при использовании метода объединенного смыва.....	62
4.3	Оценка стабильности экспериментальных серий препарата вакцины чумной живой в течении срока годности.....	64
ГЛАВА 5 Применение антигенспецифических клеточных тестов <i>in vitro</i> для оценки качества препарата вакцины чумной живой.....		
5.1	Оценка клеточного звена иммунитета у лабораторных животных вакцинированных чумной вакциной с использованием метода антигенспецифических клеточных тестов <i>in vitro</i> (КАСТ).....	68
5.2	Изучение возможности использования антигенспецифических	

клеточных тестов <i>in vitro</i> для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета у людей.....	72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	79
ВЫВОДЫ.....	90
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	92
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	93
СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	115
Приложение А.....	121
Приложение Б.....	122
Приложение В.....	123

ВВЕДЕНИЕ

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).

Современные методы оптимизации вакцин включают совершенствование биотехнологии производства с использованием нового оборудования, модернизацию методов контроля препарата и способов оценки напряженности поствакцинального иммунитета (Будыка Д.А., 2002, 2016; Абзаева Н.В., 2010; Агеев С.А., 2010; Витязева С.А., 2013; Коновалова Ж.А., 2013; Лещенко А.А., 2014; Микшис Н.И., 2015; Дерябин П.Н., 2016; Williamson E.D., 2011; Verma S.K., 2016; Li B. et al. 2017).

В России для профилактики чумы применяется живая вакцина из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. На данный момент, она остается наиболее эффективным противочумным (профилактическим) препаратом и обладает способностью после однократной прививки относительно быстро индуцировать специфический иммунный ответ (Дальвадянц С.М., 2005; Кравцов А.Л., 2011; Каральник Б.В., 2014, 2019; Фирстова В.В., 2016; Дятлов И.А., 2016; Elvin S.J., 2004; 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 бактериальной массы вакцинного штамма (Будыка Д.А., 2002; Иванова Г.Ф., 2007; Абзаева Н.В., 2010; Шаров Д.А., 2019), подбор стабилизаторов (сред высушивания) (Тинкер А.И., 1971; Гончарова М.Н., Шпилевая Э.Г., 1978; Бондаренко В.А., 1982; Лопатина Н.В., Янчулов Ш.У., Михайлова Н.Н., Наталич Н.А., 1994; Будыка Д.А., Тинкер А.И. с соавт. 1995; Valdez G.F., Giori G.S., Ruiz H.A., Oliver G., 1985), отработка температурных режимов в процессе лиофилизации вакцины (Тинкер А.И., 1971; Печников Н.Е., 1991; Дуняшева Т.Ю., 2010; Лопатин Н.В., 2018; Абзаева Н.В., 2019; Kevin R., 2019), усовершенствование этапов технологического процесса (Ефременко А.А., 2005; Фисун А.А., 2013; Лещенко А.А., 2014, 2020; Будыка Д.А., 2016; Абзаева Н.В., 2017).

В биотехнологии приготовления вакцины чумной живой необходимы качественные питательные среды, которые обеспечивают ростовые потребности чумного микроба (Филиппов А.Ф., 1982; Домотенко Л.В. 2009; Шепелин А.П., 2016). Для получения биомассы в процессе производства чумной вакцины предлагались различные среды с использованием питательных основ из сырья растительного происхождения (Чернова Э.А., 1987; Гюлушанян К.С., 1994; Старцева О.Л., 2005; Курилова А.А., 2009), мяса, рыбных продуктов, кровяных сгустков (Бахрах Е.Э., 1960; Муравьева Н.К., 1969; Филиппов А.Ф. с соавт. 1973; Шпилевая Э.Г. с соавт. 1983; Фунтикова Т.Н. с соавт. 1985; Попов А.А., 1987; Шепелин А.П., 2013), казеина (Муравьева Н.К., 1962; Sokhey S.S., 1950; Higuchi K., 1957), из ферментативного гидролизата

белков обезжиренного коровьего молока (Лещенко А.А., 2011), на основе сухого автолизата пекарских 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. Для производства вакцины на данный момент применяют питательные среды на основе гидролизатов Хоттингера или казеина, но совершенствование и конструирование новых питательных основ и сред, используемых в производстве, сохраняет свою актуальность.

Ряд авторов предлагали оптимизировать биотехнологию получения вакцины чумной живой с целью повышения жизнеспособности и стабилизации препарата при хранении: снижение концентрации и объема суспензии в ампуле (Будыка Д.А., 2002; Ефременко А.А., 2005), «закалка» препарата после лиофилизации путем выдерживания его при 37 °С (Фисун А.А., 2013), получение вакцины с малым количеством доз, минуя этап сведения (Будыка Д.А., Абзаева Н.В., 2017), применение метода микрофльтрации для концентрации микробных клеток (Ежов А.В., 2008; Лещенко А.А., 2014; Шаров Д.А., 2020).

Усовершенствование технологических этапов производства препарата, способствующее стабилизации числа живых микробных клеток чумного микроба EV в условиях производства и далее, при его хранении, является приоритетным в вопросах совершенствования живых вакцин.

Иммунологическая активность – одна из основных характеристик вакцины, отражающая ее профилактическую эффективность. Известно, что ведущая роль в формировании адаптивного противочумного иммунитета отводится клеточным факторам иммунологической защиты, а серологические реакции только косвенно указывают на наличие или отсутствие специфической резистентности организма к чуме. Ранее для определения иммуноаллергической перестройки организма после вакцинации против чумы использовалась кожная реакция на аллерген-пестин ПП (Коробкова Е.И., 1956;

Павлова Л.П., 1964; Тараненко Т.М., 1968; Белобородов Р.А., 1974; Бахрах Е.Э., 1976).

В последние годы для оценки эффективности вакцинации применяют антиген-стимулированные клеточные тесты *in vitro* с использованием технологии проточно-цитометрического анализа (Бывалов А.А., 2007; Рыжикова С.Л., 2009; Щуковская Т.Н., 2007; Шмелькова Т.П., 2008; Хайдуков С.В., Кравцов А.Л., 2011, 2016; Богачева Н.В., 2013; Литвинова Л.С., 2014; Фирстова В.В., 2015, 2017; Дерябин Н.П., 2016; 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 цитофлуориметрии.

Научная новизна работы.

Впервые разработана питательная среда на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, обеспечивающая высокий выход биомассы вакцинного штамма чумного микроба. Использование данной питательной среды при промышленном выпуске чумной вакцины позволяет повысить показатель жизнеспособности готового продукта и снизить себестоимость конечной продукции при сохранении ее качества.

Впервые апробирован «метод объединенного смыва» в биотехнологии производственного процесса вакцины чумной живой на этапе приготовления полуфабриката, позволяющий создавать идентичные условия в процессе синхронизации всех клеток взвеси, что способствует повышению качества препарата по показателю жизнеспособности.

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. В экспериментах на лабораторных животных продемонстрирована перспективность применения метода КАСТ для контроля иммуногенной активности производственных серий вакцины чумной живой.

Научная новизна подтверждена следующими документами: патент РФ № 2626568 от 28.07.2017 «Питательная среда плотная для культивирования и сбора биомассы чумного микроба вакцинного штамма *Y. pestis* EV», патент РФ на изобретение № 2680697 от 25.02.2019 «Способ оценки иммуногенности вакцины чумной живой с использованием антигенспецифических клеточных тестов *in vitro*», патент РФ на изобретение № 2725872 от 07.07.2020 «Способ применения комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба для оценки уровня противочумного иммунитета».

Теоретическая и практическая значимость работы. Сконструирована питательная среда для культивирования чумного микроба, отвечающая требованиям НД по биологическим и физико-химическим показателям.

Показана возможность применения питательной среды на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС) для масштабированного производства вакцины чумной живой. Методика приготовления и рецептура сконструированной среды изложены в Промышленном регламенте (ПР) № 01897080-34-17 на производство Питательного агара для культивирования микроорганизмов (ГКЭС) (протокол заседания Ученого Совета института № 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 заседания Ученого Совета института № 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, накожного скарификационного нанесения и ингаляций (протокол заседания Ученого Совета института № 6 от 30.06.17, подано заявление о внесении изменений в регистрационное досье № 140279) и утверждены директором института.

Оптимизирована биотехнология производства препарата вакцины чумной живой путем объединения двух микробных взвесей в одну для создания идентичных условий синхронизации микробных клеток биомассы вакцинного штамма *Y. pestis* EV, путем выдерживания ее при температуре (4 ± 2) °С в течение 48 ч, где происходит накопление клеток, находящихся в стационарной фазе роста, как наиболее устойчивых. Полученные практические результаты внесены в нормативную документацию в форме Изменений № 1 в ПР 01897080-09-16 на производство вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций (протокол заседания Ученого Совета института № 6 от 20.09.17, подано заявление о внесении изменений в регистрационное досье № 140279) и утверждены директором института.

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 заседания Ученого Совета института № 6 от 26.12.17) и утверждены директором института.

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, соответствующей регламентированным требованиям.

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 двух плановых тем НИР: «Разработка технологии соево-глутеновых питательных сред для применения в производстве вакцины чумной живой» № ГР 115022670069 (2015-2017 гг.), «Экспериментальное обоснование совершенствования биотехнологии производства вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, накожного

скарификационного нанесения и ингаляций» № ГР АААА-Б18-218091490014-1 (2015-2017 гг.).

Материалы, изложенные в диссертации, представлены и обсуждены на научно-практической конференции молодых ученых (2017 г.) и итоговых научно-практических конференциях ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (2017 г., 2019 г.).

Материалы диссертации представлены на III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 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); II Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2017); 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.

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Пути совершенствования биотехнологии производства вакцины чумной живой

Чума была и остается одним из самых опасных инфекционных заболеваний. Вспышки чумы в природных очагах, риск завоза и распространения инфекции связаны в основном с проведением массовых спортивных мероприятий, развитием культурных и экономических межгосударственных связей, военными конфликтами, миграционными процессами и возможными актами биотерроризма.

Проблемы биобезопасности в наши дни чрезвычайно актуальны, в связи с этим разработка и усовершенствование надежных средств для специфической профилактики чумы, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию этой инфекции, на сегодняшний момент остаются одним из перспективных направлений (Онищенко Г.Г., 2010; Бугоркова С.А., 2013; Витязева С.А., 2013; Кутырев В.В., 2013; Микшис Н.И., 2019).

Производство и контроль биопрепаратов регламентируются специальными требованиями надлежащей производственной практики (приказ Минпромторга № 916 от 14.06.2013 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств» и ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств»). Критерии и параметры, которым должен соответствовать каждый препарат, изложены в Международных требованиях ВОЗ и, прежде всего, это касается безопасности и специфической активности препарата.

Качество вакцинного препарата характеризуется главным образом его безопасностью и эффективностью, о которых судят по множеству показателей, определяемых физико-химическими, микробиологическими,

иммунологическими, клиническими и иными методами (Медуницин Н.В., 2010; ФСП 42-8654-07).

В мире зарегистрировано 6 препаратов: вакцина чумная живая (сухая) (Россия, Казахстан), чумная живая таблетированная (Россия), чумная живая из аттенуированного штамма Харбин (Индонезия), жидкая инактивированная I.P. (Индия), вакцина USP из вирулентного штамма 195/P убитого формальдегидом (США) и вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная (ВЧММ) (Бугоркова С.А., 2013; Фирстова В.В., 2017; Микшис Н.И., 2019). На данный момент производство и применение вакцины чумной живой для специфической профилактики чумы ограничено, так как из представленных препаратов выпускается только один.

Исходный вирулентный штамм *Y. pestis* EV был выделен в 1926 г. Ж. Жираром и Р. Робиком из трупа человека, погибшего от бубонной формы чумы, а затем аттенуирован путем многочисленных пересевов на искусственных питательных средах при 18-25 °С в течение 6 лет. Его «авирулентность» для лабораторных животных и высокие иммуногенные свойства, стабильность характеристик на протяжении длительного времени наблюдений, безвредность и сравнительно низкая реактогенность для человека позволили принять этот штамм за эталон живой противочумной вакцины (Гинсбург Н.Н., 1969; Коробкова Е.И., 1956). В 1936 г. вакцинный штамм EV был передан советским ученым из Пастеровского института.

К началу второй мировой войны были опубликованы материалы по изучению ряда живых вакцин на животных и людях: Ж. Жирара и Р. Робика (штамм EV), Л. Оттена (штамм Тживайдеж), М.П. Покровской (штамм АМП), Н.Н. Жукова-Вережникова (штамм ЖВ-R), Е.И. Коробковой (штамм 46-S), Д.А. Джаветса и Х.Б. Майера (штамм А-1112), Кассуга (штамм МП-40) и несколько позже А.П. Ящук (штамм MN-74). Для практического применения были завершены работы по отбору лучшей вакцинной линии штамма *Y. pestis* EV и разработана технология ее производства (Файбич М.М., Карнеев Р.В., 1947; Копылов Н.Ф., 1947; Чалисов И.А., 1947; Салтыков А.С., 1947). В 1940-1941 гг.

данный препарат прошел испытания на добровольцах, в 1942 г. был апробирован более чем на 70 000 человек.

Ценный вклад в практическое использование вакцины EV внесли сотрудники Научно-исследовательского института эпидемиологии и гигиены Красной Армии (НИИЭГ), которые разработали метод ее лиофилизации, что дало возможность длительно сохранять исходные свойства штамма (Коробкова Е.И., 1956; Файбич М.М., 1983). Использование метода лиофильного высушивания вакцинной взвеси позволило увеличить срок годности препарата до 2 лет и более.

Выпуск вакцины чумной живой в больших объемах был лимитирован отсутствием производительного способа накопления бактериальной массы и возможностью одномоментно высушивать большие количества вакцинной взвеси.

Для получения бактериальной массы вакцинного штамма длительное время использовали матрасы с агаром или бутылки с бульоном, а в конце 50-х годов начали использовать реакторы-ферментеры и аппарат для культивирования микроорганизмов Шестеренко (АКМ-Ш). В настоящее время в технологии производства вакцины чумной живой предусмотрены два эквивалентных метода получения биомассы: поверхностным методом (на плотной питательной среде) в АКМ-Ш и глубинным методом периодического культивирования в реакторе (ПР 01897080-09-16).

В России и СНГ с 1942 г. достаточно успешно применяется живая вакцина из штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ и на данный момент она остается единственным препаратом для иммунизации против чумы (Домарадский И.В., 2009).

На территории Российской Федерации выпуск препарата «Вакцина чумная живая лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций» осуществляется в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора с 1958 года.

За многие годы выпуска коммерческого препарата вакцины чумной из штамма *Y. pestis* EV хорошо отработана технология ее изготовления, но, несмотря на высокую степень оснащения технологическим оборудованием, четкую регламентированность всех производственных этапов, его все же нельзя признать совершенным. Выпускаемый препарат может быть нестандартен по общей концентрации микробов, по процентному содержанию живых клеток, остаточной влажности, внешнему виду и другим показателям (Ракитина Е.Л., 1988; Ефременко А.А., 2005; Будыка Д.А., 2016). Тактика усовершенствования чумной вакцины в настоящее время осуществляется в направлении модернизации биотехнологии, методов контроля, дальнейшей стандартизации препарата, его специфической активности и подбора полноценных питательных сред на основах, имеющих низкую себестоимость, что является актуальным для выполнения производственных задач (Анисимова Т.И., 1979; Titball R.W., 2004; Бывалов А.А., 2007; Коновалова Ж.А., 2013; Микшис Н.И., 2015; Verma S., 2016; Yang R., 2018).

Анализируя литературные данные, можно выделить ряд научно-исследовательских направлений по совершенствованию вакцины чумной живой.

1) Разработка высокопродуктивных питательных сред и оптимизация качества используемых плотных сред (Филиппов А.Ф., 1969; Бахрах Е.Э., 1971; Шиманек Н.Я., Мишанькин Б.Н., 1982; Шеремет О.В., Терентьев А.Н., Шатова И.Н., Морозова Л.Н., 1987; Гюлушанян К.С., 1994; Катунина Л.С., 2002; Старцева О.Л., 2005; Курилова А.А., 2009; Лещенко А.А., 2011; Антонычева М.В., 2012).

Все физико-химические процессы, протекающие в клетках микроорганизмов, связаны с составом и видом (жидкие или плотные) питательных сред, в которых происходит культивирование (Уша Б.В., 2009). В промышленном выращивании микроорганизмов важно знать оптимальный баланс веществ в питательной среде для подбора наиболее сбалансированного состава.

Для получения биомассы в процессе производства экспериментальных и коммерческих серий чумной вакцины предлагались различные среды, приготовленные на питательных основах из мяса (Merck E., 1988; Комоско Г.В., 1997; Смирнова Е.Б., 2002), рыбы, кровяных сгустков (Муравьева Н.К., 1969; Филиппов А.Ф. с соавт. 1973; Шпилева Э.Г. с соавт. 1983; Фунтикова Т.Н. с соавт. 1985; Попов А.А., 1987; Шепелин А.П., 2013), растительного сырья (Гюлушанян К.С., 1994; Старцева О.Л., 2005; Курилова А.А., 2009; Катунина Л.С., 2017), казеина (Sokhey S.S., 1950; Higuchi K., 1957; Муравьева Н.К., 1962; Николаев И.И., 1969; Barroetabena M.F., 1989; Мохов Д.А., 1998), дрожжей (Покровский А.А., 1972; Шеремет О.В., 1978; Терентьева Л.И., 1979; Шамсудинова Б.М., 2003; Антонычева М.В., 2012), из ферментативного гидролизата белков обезжиренного коровьего молока (Лещенко А.А., 2011).

Для увеличения скорости роста микроорганизмов и большого выхода биомассы в питательные среды вносят стимуляторы роста – витамины, аминокислоты, минеральные соли (Харькова Н.М., 1983; Дробышева Т.М., 1984; Катунина Л.С., 1987; Терентьева Л.И., 1990; Абзаева Н.В., 2020).

При создании новых питательных сред или совершенствовании уже существующих, важным начальным этапом является выбор оптимальных белковых питательных основ, которые во многом определяют качество конечного продукта (Шепелин А.П., 2016). Главное требование к питательной среде, применяемой в производстве вакцины чумной – максимальный выход жизнеспособной микробной массы, состоящей из популяции клеток, обладающих всеми типичными свойствами, присущими исходной культуре.

С питательной средой связаны возможности управления качеством и стандартностью готового препарата, и актуальность работ в данном направлении обусловлена очевидной заинтересованностью как производителя, так и потребителя в снижении себестоимости готового препарата с сохранением или даже улучшением регламентированных параметров.

2) Стабилизация чумной вакцины в процессе хранения (Чичерин Ю.В., Лебединский В.А., 1979; Швецов С.А., Черкасов Н.А., 1998; Фисун А.А., 2013)

и оптимизация стабилизаторов для вакцины (Тинкер А.И., 1971; Шпилевая Э.Г., 1978; Белоус А.М., 1982; Аркадьева З.А., 1983; Valdez G.F., Giori G.S., Oliver G., 1985; Лопатина Н.В., 1994; Будыка Д.А., Тинкер А.И., 1995).

На стабильность вакцины чумной живой значительное влияние оказывают условия ее культивирования, лиофилизации, последующего хранения и транспортирования (Будыка Д.А., 2012, 2013; Давыдов Д.С., 2017; Николаева Л.Л., 2017; Зуенко А.А., 2018; Лопатин Н.В., 2018).

Для сохранения бóльшего процента жизнеспособных клеток в вакцине при лиофилизации применяют комплекс стабилизаторов (среда высушивания), который также способствует длительному сохранению свойств препарата в условиях консервации. Оптимальная среда высушивания содержит целый ряд таких веществ, насчитывающих в разных комбинациях более десяти химических соединений (Тинкер А.И., 1971; Белоус А.М., 1975; Белоус А.М., Бондаренко В.А., 1982; Аркадьева З.А., 1983). В производстве вакцины использовались среды высушивания, которые, помимо сахарозы и желатина, содержат антиметаболиты – тиомочевину, молибденовокислый аммоний, глютамат натрия и т.д. (Печникова И.В., 1974; Красикова М.А., 1969; Гончарова М.Н., Шпилевая Э.Г., 1978; Чернова Э.А., 1978), что позволяет повысить качество чумной вакцины в процессе хранения.

3) Оптимизация температурных режимов культивирования и выращивания бактериальной массы в биотехнологии производства вакцины чумной живой (Иванова Г.Ф., Будыка Д.А., Гюлушанян К.С., Руднев С.М., 1998; Будыка Д.А., 1999).

Существенным фактором, влияющим на физиологическое состояние микробных клеток, в том числе и на их устойчивость к неблагоприятным воздействиям в процессе производства, является оптимизация температурного режима культивирования бактериальной массы в технологии производства препарата (Будыка Д.А., 1999; Иванова Г.Ф. с соавт., 1998; Абзаева Н.В., 2010).

Регламентированная температура культивирования, обеспечивающая наибольший выход биомассы, равна (27 ± 1) °С (Будыка Д.А., Тинкер А.И., 1995;

Будыка Д.А., 2002; Будыка Д.А., Васильева А.А., 2004; ПР 01897080-09-16). При этом, согласно литературным данным (Алутин И.М., 1974), снижение температуры культивирования чумного микроба до 20-25 °С значительно улучшает качество вакцины за счет возрастания в биомассе процента живых микробных клеток. Температурный фактор определяет соответствующий уровень физиологической и метаболической активности микробов и способствует их бóльшей устойчивости к лиофилизации (Кондрашин Ю.И., 1979; Ракитина Е.Л., 1988; Тинкер А.И., Будыка Д.А. с соавт., 1994; Иванова Г.Ф., 1998; Абзаева Н.В., 2007, 2009).

4) усовершенствование этапов технологического процесса (Ракитина Е.Л., 1988; Коваленко В.Н., 2001; Ефременко А.А., 2005; Лещенко А.А., 2014; Будыка Д.А., 2016; Абзаева Н.В., 2017).

С помощью теоретических расчетов была показана возможность выпуска вакцины чумной с единым количеством доз в ампуле в различных сериях (Ракитина Е.Л., 1998).

Разработана вакцина чумная со сниженным числом доз в ампуле (Будыка Д.А., 2002; Будыка Д.А., Васильева А.А., 2004; Абзаева Н.В., 2005; Ефременко А.А., 2005; 2007). Было доказано, что экспериментальная вакцина со сниженной концентрацией микробных клеток в ампуле обладает качественными характеристиками, превосходящими стандартные коммерческие образцы по жизнеспособности и термостабильности (Тинкер А.И., Будыка Д.А., Верховцева Г.Н., Печников Н.Е., 1991; Будыка Д.А., 2002; Васильева А.А., 2004; Ефременко А.А., 2005).

Получение вакцины с малым количеством доз путем уменьшения количества микробных клеток и объема суспензии в ампуле, минуя этап сведения, существенно повышает устойчивость конечного продукта на технологических этапах розлива и лиофилизации, увеличивает стабильность при хранении и снижает диапазон колебаний количества живых микробов в дозе (Будыка Д.А., Абзаева Н.В., 2017).

Уменьшение объема бактериальной суспензии с 2 мл до 1 мл в ампуле способствует более эффективному удалению из препарата влаги и снижению времени лиофилизации, что в итоге способствует стабилизации показателя жизнеспособности микроорганизмов в процессе хранения (Тинкер А.И., Будыка Д.А., 1993; Бондаренко А.И., 1998; Ефременко А.А., 2007).

Обоснована возможность применения метода микрофльтрации в технологии получения таблетированной вакцины (Ежов А.В., 2008; Лещенко А.А., 2014; Шаров Д.А., 2020). Вакцинный препарат, приготовленный из концентрата микробных клеток *Y. pestis* EV, полученный методом мембранного разделения, сохраняет свои биологические свойства в течение всего срока годности.

Оптимизация технологических этапов производства препарата может способствовать повышению показателя жизнеспособности, стабилизации числа живых микробных клеток чумного микроба в условиях производства и далее при его хранении, что является приоритетным в вопросах совершенствования живых вакцин.

5) Поиск инновационных подходов, направленных на автоматизацию производства препарата и регулирование процессов с применением современных автоматизированных систем управления, которые осуществляют непрерывный мониторинг критических параметров в режиме реального времени и вносят требуемые корректировки для обеспечения стандартности процесса и продукта (Шаров Д.А., 2017; Лопатина Н. В., 2018).

Промышленное изготовление вакцин требует использования специальной аппаратуры и оборудования, комплектование которых производится в соответствии с конкретными условиями и объемом выпускаемой продукции. Для получения вакцин высокого качества в производстве применяют стандартные утвержденные методики (технологические процедуры и методы контроля), а сырье и реактивы должны отвечать требованиям международной (национальной) фармакопеи и подвергаться обязательному входному контролю.

Все иммунобиологические препараты, применяемые на территории РФ, подлежат обязательной проверке соответствия свойств каждой серии препарата установленным при регистрации требованиям. Качество вакцинного препарата характеризуется главным образом его безопасностью и эффективностью, это наиболее важные свойства вакцины, которые тщательно исследуются и контролируются в процессе производства и применения вакцин.

В биотехнологическом процессе вакцинного производства важны все звенья: от подбора производственных штаммов и питательной среды до конечных этапов – стандартизации и расфасовки биопрепарата.

1.2 Формирование иммунного ответа на вакцинацию против чумы, методы определения противочумного иммунитета

В современном мире тема вакцинопрофилактики является актуальной. Эффективность вакцинации в первую очередь зависит от качества вакцины, от правильности ее введения, от точности дозировки, интервалов между инъекциями и, конечно, от состояния иммунитета вакцинированных людей (Бугоркова С.А. с соавт., 2018).

Специфическая профилактика особо опасных инфекций – основа медицинского обеспечения биологической безопасности лиц из групп риска инфицирования микроорганизмами I-II групп патогенности, что закреплено действующими санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и приказом Минздравсоцразвития РФ от 31.01.2011 № 51н «О национальном календаре профилактических прививок и календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям».

Важное преимущество вакцины это ее способность после однократной прививки относительно быстро индуцировать специфический иммунитет против чумной инфекции (Самойлова Л.В., 1963). После однократной иммунизации уже на 7-е сут начинает формироваться противочумный

иммунитет, который сохраняется на протяжении 10-12 мес. Вакцинацию проводят в плановом порядке и по эпидемическим показаниям (Медуницин Н.В., 2010). Подкожная вакцинация надежнее, чем накожная, но более реактогенна (Николаев Н.И., 1968). Ингаляционный метод иммунизации, несмотря на ряд преимуществ, приписываемых ему автором (Лебединский В.А., 1971), широкого распространения не получил. То же относится к конъюнктивальному способу (Смирнов В.П., 1962). Прививки живой вакциной могут сопровождаться общей и местной реакцией. Интенсивность реакций зависит как от индивидуальных особенностей привитых, так и от метода иммунизации.

Иммуногенность препарата напрямую связана с его жизнеспособностью, так как вводимые при вакцинации живые клетки формируют ответную иммунологическую реакцию тем лучше, чем более они активны, а количество «балласта» в виде отмерших клеток во вводимой дозе оказывается ниже, что дает меньший уровень сенсibilизации организма (Майский И.Н., 1953; Алиев М.Н., 1958; Козлов М.П., Лемехова А.Е., 1960; Тинкер А.И., 1964; Анисимова Т.И., Сергеева Г.М., 1982; Будыка Д.А., 1987; Merlin M., 1999).

Вакцина чумная живая способна создавать длительный (до 1 года) и достаточный по напряженности иммунитет у прививаемых контингентов. Иммуногенность вакцины проверяют на лабораторных животных и выражают в иммунизирующих единицах, т.е. в дозах антигена, защищающих 50 % иммунизированных животных, зараженных определенным числом инфицирующих доз (ED_{50}). Чумной штамм EV является не только основным вакцинным штаммом, из которого уже несколько десятилетий подряд готовят коммерческий препарат, но и эталоном для сравнения иммуногенных свойств новых (кандидатных) вакцин против чумы в сравнении с зарегистрированными препаратами.

Также необходимо отметить, что качество вакцины, поступающей к потребителю, зависит не только от условий производства и контроля, но и от того, в каких условиях она транспортируется. Транспортировка и хранение

требуют строгого соблюдения требований «холодовой цепи», так как при нарушении температурного режима изменяются физико-химические свойства живых вакцин – их иммуногенность снижается, а реактогенность повышается (Медуницин Н.В., 2010; Хаитов Р.М., 2013; СП 3.3.2.3332-16).

Исследователями доказано, что в формировании противочумного иммунитета основу составляет клеточное звено, где участвуют в основном три клеточные системы: макрофаги, Т- и В-лимфоциты (Philipovski A.V., 2007; Levy O., 2014; Фирстова В.В., 2015).

Однако показатели (референтные пределы) такового, которые бы объективно отражали защитные уровни клеточных реакций, для человека не определены. Соответственно отсутствуют нормативно закрепленные стандарты для оценки уровня противочумного иммунитета у людей.

При иммунизации живой вакциной противочумный иммунитет формируется при наличии двух фаз: нестерильной и стерильной, при этом длительность и напряженность иммунитета в целом напрямую зависит от продолжительности и выраженности нестерильной фазы.

Вакцинация людей вакциной чумной живой сопровождается выраженными изменениями иммунного статуса и затрагивает практически все звенья иммуногенеза. Происходят значительные сдвиги в количественном соотношении иммунокомпетентных клетках крови – фагоцитах и лимфоцитах. Увеличение количества Т- и В-лимфоцитов в крови вакцинированного организма свидетельствует об усилении процессов пролиферации в иммунокомпетентных органах, миграции и рециркуляции в них. Популяционные, субпопуляционные сдвиги, изменения функциональной активности лимфоцитов в общем (у основной массы людей) укладываются в рамки представлений об эффективно протекающем иммунобиологическом процессе (Кетлинский С.А., 2002).

Механизм иммунного ответа на введение вакцинного штамма *Y. pestis* EV соответствует общему принципу иммунной реакции организма на внедрение генетически чужеродного материала. *Y. pestis* фагоцитируются двумя типами

«профессиональных» фагоцитов – макрофагами и нейтрофилами. Затем внутри макрофага происходит внутрифагоцитарный киллинг бактерий, транспорт фрагментов антигенов на поверхность фагоцита и их презентация CD4⁺ Т-хелперам (Th). При этом возрастает способность макрофагов синтезировать IL-1, что, в свою очередь, индуцирует секрецию IL-2 Т-лимфоцитами. Начинает работать система цитокиновой регуляции при иммуногенезе. В результате антигензависимой дифференцировки CD4⁺ Т-хелперов образуются два типа клеток – Th1 и Th2. Первые из них синтезируют цитокины, участвующие в основном в реакциях клеточного иммунитета, а вторые стимулируют образование антител. Одновременно активируются CD8⁺ Т-клетки. Т-хелперы взаимодействуют с антигенспецифичными В-лимфоцитами, запуская их дифференцировку и пролиферацию, вследствие чего образуются клетки памяти и плазматические клетки. Некоторые антигены активируют В-лимфоциты без участия Т-хелперов (Т-независимая индукция гуморального ответа) (Фирстова В.В., 2015). Взаимодействие Т- и В-лимфоцитов и совместная их работа с макрофагами обеспечивают всю гамму иммунологических реакций, развивающихся в ответ на антиген. Иммунологическая память, особенно память Т-лимфоцитов, очень стойкая, благодаря чему удается искусственно формировать длительный противоиnфекционный иммунитет.

Опыт мировой практики по иммунопрофилактике показывает, что среди вакцинированных всегда имеется группа лиц, не отвечающих на введение вакцины или слабо реагирующих на нее за счет отсутствия у молекулы HLA II класса участков, распознающих конкретный антиген. Также при многократной вакцинации вторичный иммунный ответ развивается быстро, а спустя несколько месяцев титры специфических антител резко снижаются, но это не говорит об исчезновении иммунитета (Омельченко Н.Д., 2017). Отсутствие антител не всегда свидетельствует об утрате иммунитета и наоборот, их наличие после вакцинации еще не гарантирует защиту от инфекции (Бугоркова С.А. с соавт., 2018).

На протяжении многих лет одним из способов выявления противочумного иммунитета служила внутрикожная проба со специфическим бактериальным аллергеном, нашедшая широкое применение как в оценке развития и напряженности иммунитета, так и для диагностики инфекционных заболеваний (Павлова Л.П., 1964; Тараненко Т.М., 1968).

После перенесения чумной инфекции также, как при профилактической вакцинации, возникает иммуноаллергическая перестройка организма, которая может быть выявлена с помощью внутрикожной пробы с различными аллергенами чумного микроба (Павлова Л.П., 1964). Для постановки внутрикожной пробы использовали корпускулярный аллерген и экстракт убитой культуры – пестин безмикробный (Тараненко Т.М., 1968). Совершенствование аллергенных препаратов чумного микроба шло от корпускулярных бактериальных аллергенов к очищенным его фракциям. Ряд исследователей считали, что кожно-аллергическая реакция на пестин может служить хорошим показателем устойчивости организма к чуме, но только при учете особенностей антигенного состава микробов вакцинного штамма (Лясоцкий Л.Л., 1971; Веркина Л.М., 1995).

В 70-е годы для определения иммуноаллергической перестройки организма после вакцинации против чумы использовался аллерген-пестин ПП, представляющий собой полипептидно-полисахаридный комплекс, извлеченный из вакцинного штамма чумного микроба путем кислотного гидролиза с последующим осаждением спиртом и высушиванием полученного осадка (Тараненко Т.М., 1988). Также для кожных проб использовали фракцию I и ацетонвысушенные клетки EV. В этих работах различия в интенсивности кожных реакций у животных, павших после заражения (нерезистентных), проведенного одновременно с постановкой кожных проб, и у перенесших заражение (резистентных), не были статистически достоверными (Белобородов Р.А., 1974).

Как следует из изложенного, метод внутрикожных аллергических проб в иммунологической оценке поствакцинальных событий у привитых живой

чумной вакциной широкого внедрения так и не получил, независимо от попыток использовать с этой целью различные антигены чумного микроба или их комплексы, в том числе и в связи с побочными реакциями организма на введение аллергена (ухудшение состояния вакцинированных, развитие некроза на месте постановки кожной реакции).

Об эффективности иммунобиологической перестройки организма и работе иммунной системы можно судить по клеткам крови, что приобрело большое практическое значение при оценке противочумного иммунитета. Так, для оценки напряженности специфического иммунитета В.А. Фрадким (1985) был предложен тест повреждения нейтрофилов (ППН), суть которого состоит в усилении амебоидной активности и повреждении нейтрофилов крови сенсibilизированных лиц при контакте со специфическим аллергеном. Помимо того, Н.В. Емельяновой (1993) было предложено исследовать активность пролиферации лимфоцитов в реакции бласттрансформации и интерлейкинов 1 и 2 при воздействии основными антигенами (капсульный антиген, мышинный токсин, ЛПС, ОСА, пестин).

Учитывая неперспективность инвазивных методов оценки клеточного противочумного иммунитета, рядом исследователей проведен поиск иммунологических маркеров, указывающих на наличие и степень напряженности противочумного иммунитета в клеточных реакциях *in vitro* (Фирстова В.В., 2010, 2015; Шатрова А.Н., 2011; Богачева Н.В., 2013; Aghaeerour N., 2013; Литвинова Л.С., 2014; Ключева С.Н., 2015).

Предпринимались попытки выявлять противочумный иммунитет по усилению дегрануляции гранулоцитов под влиянием аллергена чумного микроба (микробного пестина) в условиях *in vitro*. Способность аллергена чумного микроба активировать секреторную функцию нейтрофилов крови человека в условиях *in vitro* зависела от длительности периода, прошедшего после вакцинации (Кравцов А.Л., 2011).

Показана возможность и перспектива исследования напряженности клеточного иммунитета против туляремии и чумы по показателям

антигенреактивности Т-лимфоцитов (экспрессия CD69) и спленоцитов (активация синтеза ИФН- γ и ИЛ-17) в реакциях *in vitro* при активации специфическими антигенами (Фирстова В.В., 2010, 2015).

Также оценка клеточного звена противочумного иммунитета определялась по изменению показателей иммунорегуляторных цитокинов, при этом были выявлены наиболее информативные цитокины-маркеры (IFN γ и TNF α), по изменению которых можно косвенно судить о степени выраженности иммунитета у людей (Клюева С.Н., 2014, 2015, 2018). Полученные данные показывают, что при повторной вакцинации (ревакцинации) антигенспецифический клеточный ответ развивается быстрее (Дерябин П.Н., 2016).

Для оценки начальной стадии иммунного ответа на введение вакцины чумной был разработан реагент для выявления лимфоцитов с рецепторами (ЛфР) к антигену F1 *Y. pestis*, которые обнаруживаются уже на вторые сутки после вакцинации (Дерябин П.Н., 2016; Каральник Б.В., 2019).

Доступным способом оценки противочумного иммунитета у вакцинированных является определение уровня специфических антител, для которого применяется коммерческий препарат «Тест-система иммуноферментная для выявления антител к чумному микробу (ИФА-Ат-ФІ *Y. pestis*)» (Бывалов А.А., 2007; Девдариани З.Л., 2013; Клюева С.Н., 2018).

Серологическая оценка не отражает в полной мере уровень перестройки организма после вакцинации и не коррелирует с функциональной активностью клеток врожденного и адаптивного иммунитета (Бывалов А.А., 2007; Бугоркова С.А., 2020), однако, несмотря на многочисленные исследования в данной области, вопрос об оценке эффективности вакцинации остается открытым.

Отсутствие критериев для оценки напряженности клеточного иммунитета против чумы обуславливает невозможность объективного проведения иммунологического мониторинга контингента из групп профессионального риска, подлежащего иммунизации против чумы, так как ревакцинация лиц, ещё

иммунных к *Y. pestis*, не будет иметь должного эффекта, а соответственно снизится эпидемиологическая эффективность иммунизации.

Учитывая вышеизложенное, разработка или усовершенствование существующих алгоритмов оценки специфической активности поствакцинального клеточного иммунитета, который бы четко коррелировал с антиинфекционной резистентностью к возбудителю чумы, является актуальным направлением.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

2.1.1 Характеристика вакцинных противочумных препаратов и вирулентных культур

В работе были использованы: вакцинный штамм чумного микроба *Y. pestis* EV линии НИИЭГ получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (номер депонирования ГКПМ 910301); для заражения экспериментальных животных – вирулентный штамм чумного микроба *Y. pestis* 231, выделенный в 1947 г. от серого сурка, получен из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (инв. № 52). Штамм имеет типичные для чумного микроба морфологические, культуральные и биохимические свойства. Характеристика использованных штаммов представлена в таблице 1.

2.1.2 Реактивы, сырье

При выполнении работы применяли следующие реактивы и сырье: натрий хлористый (ГОСТ 4233-77, чда); натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный (ГОСТ 4172-76, чда); натрий сернистокислый (ГОСТ 195-77, чда); натрий углекислый (ГОСТ 83-79, чда); натрия гидроокись (ГОСТ 4328-77, чда); уголь активированный «ОУ-А» (ГОСТ 4453-74); соль Мора (ГОСТ 4208-72); хлороформ (ГОСТ 20015-88, в/с); соляная кислота (ГОСТ 3118-77, чда); спирт этиловый «Экстра» (ГОСТ 5962-67); масло иммерсионное «Кедровое» (ГОСТ 13739-78); агар микробиологический (ГОСТ 17206-96); поджелудочная железа крупного рогатого скота (ГОСТ 11285-93); мясо говяжье (ГОСТ 779-55); казеин пищевой (ГОСТ 53667-2009); тиомочевина (ГОСТ 6344-73); желатин (ГОСТ 23058-89); кукурузный экстракт сгущенный (ТУ-8-5344-113607);

Таблица 1 – Характеристика штаммов чумного микроба, использованных в работе

Наименование и обозначение штамма	Морфологические и тинкториальные свойства	Культуральные свойства	Биохимические свойства	Иммуногенные свойства
Вакцинный штамм чумного микроба линии НИИЭГ <i>Y. pestis</i> EV	В мазках из агаровой и бульонной культуры - короткие грамтрицательные полиморфные, размером 0,3×0,1 мкм, биполярно окрашенные, располагающиеся цепочками, неподвижные палочки. Инкубированные при температуре (37±1) °С на агаре Хоттингера бактерии образуют капсулу.	Колонии шероховатого типа с бугристым центром коричневого цвета и «кружевной» периферией. В бульоне - агглютинативный рост с образованием рыхлого осадка на дне пробирки, без помутнения бульона.	Штамм не разлагает рамнозу, сахарозу, лактозу и глицерин в течение 6 сут.	Показатель ED ₅₀ для морских свинок не более 10 ³ м.к., для белых мышей - 10 ⁴ м.к.
Вирулентный штамм чумного микроба <i>Y. pestis</i> 231 (461)	Грамотрицательные палочки с закругленными краями, неподвижные, размером 0,3×0,1 мкм. При температуре (37±1) °С на агаре Хоттингера образуют капсулу.	На агаре Хоттингера pH 7,2±0,1 со стимуляторами роста при температуре (27±1) °С штамм дает рост колоний через 24±1 ч, формируя «кружевные платочки», через 48±1 ч – колонии с шероховатым центром, коричневого цвета и кружевной зоной. На бульоне Хоттингера бактерии растут в виде придонного хлопьевидного осадка.	Штамм не разлагает лактозу, сахарозу, рамнозу. Редуцирует глюкозу, маннит, глицерин, арабинозу, салицин.	Для белых мышей 1 Dc1 - 50 ж.м.к., 1 LD ₅₀ – 20-25 ж.м.к.; для морских свинок 1 Dc1 - 100 м.к., 1 LD ₅₀ - 40-50 ж.м.к.

вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72); конъюгаты антител против антигенов лимфоцитов CD3⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺ (Becton Dickinson, США); лизирующий раствор (Becton Dickinson, США); Cell Wash, отмывочная жидкость (Becton Dickinson, США); FACS Flow, проточная жидкость (Becton Dickinson, США); среда RPMI-1640 с 25 mM HEPES (Пан-Эко, Россия); комплекс водорастворимых антигенов *Y. pestis* EV (BrAg), приготовленный по методике Е.Н. Афанасьева (1986).

2.1.3 Питательные среды

Основные питательные среды: агар и бульон Хоттингера (рН 7,2±0,1 и 7,4±0,1), приготовленные в соответствии с ТУ № 9385-004-01897080-2009 и ТУ № 9385-002-01897080-2009; кукурузно-казеиновая питательная среда; среда высушивания (тиомочевинная) (рН 7,6±0,1), в соответствии с ПР 01897080-09-16; среда Сабуро и тиогликолевая среда в соответствии с ФСП 42-8654-07 (рН 7,0±0,1), получены из лаборатории питательных сред для культивирования микроорганизмов I-IV групп патогенности ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Экспериментальной питательной средой для выращивания биомассы в процессе производства вакцины чумной живой служил питательный агар (ГКЭС) – плотная среда на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, включающая соль Мора и натрий сернистокислый.

2.1.4 Лабораторные животные

В опытах (иммунизация, заражение, отбор проб крови) использованы аутбредные белые мыши массой 18-20 г, морские свинки породы «Агути» массой 250-300 г, кролики массой 1,5-2,5 кг обоего пола. В опыт брали животных после 5-10 – дневного карантина. В процессе содержания животных поддерживали рекомендуемый режим питания согласно приказу МЗ СССР № 1179 (1983). Работа с животными проводилась в соответствии с «Правилами

проведения работ с использованием экспериментальных животных», СП 1.3.1285-03, «Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских целях» (2010), Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях (Страсбург, 1986). Количество животных для экспериментов брали с учетом получения статистически достоверных результатов.

2.1.5 Оборудование

Для изготовления, стерилизации и контроля гидролизатов и питательных сред использовали: реактор гидролиза животных белков (ООО «ЮВС», г. Обнинск); стерилизатор паровой STERIVAP HP IL («MMM GmbH», Чехословакия); весы электронные BM 510Д (ООО «ОКБ Веста»); газовая плита ПГ 4-П; дистиллятор паровой ПД - 200М (ОАО «Тамбовский завод «Комсомолец»); микроскоп биологический «Биолам» (ЛОМО ТУ 3-3154-82, г. Санкт-Петербург); прибор Валента (в соответствии с МУК 4.2.2316-08, с. 20); СО мутности бактериальных взвесей 42-28-85 соответствующего года выпуска 10 МЕ (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); рН-метр милливольтметр рН-150 МИ, (ООО «Измерительная техника»); стерилизатор паровой автоматический для стерилизации растворов и питательных сред ВКа-75-Р-«ПЗ» (Касимовский приборный завод); термостат суховоздушный ТС-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ»).

Для производства вакцины живой чумной применялось следующее оборудование: ультразвуковая моечная машина ампул АСQ-1(Китай); аппарат для культивирования микроорганизмов Шестеренко (АКМ-Ш) (Московского экспериментального завода «Технолог»); насос перистaltический для дозированного розлива биопрепаратов BT300-1F/YZ1515X (США); низкотемпературный морозильник DF 8517S (Ю. Корея (Il Shin)); пилотная лиофильная сушка LP 25R, LR 30R, (Ю. Корея (Il Shin)), шкаф сушильный вакуумный ШСВ-27/35 (Казанский завод медицинской аппаратуры);

электронный микроскоп JEM 100sx «JEOL» (Япония); весы аналитические RV-214 (Китай); микроскоп биологический БИОЛАМ (Россия); рН-метр базовый РВ-11-Р11(Франция); термостат суховоздушный TCO-200 СПУ (Россия).

Для определения экспрессии рецепторов (CD25, HLA-DR) на поверхности лимфоцитов: проточный цитофлуориметр FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Программное обеспечение: Mac OS «Apple», (США); Пакет анализа Cell Quest Pro (Becton Dickinson, США); термостат ТС 1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия); центрифуга ЕВА-200 «Hettich» (Германия); перемешивающее устройство «Vortex» «BioSan» (Латвия); CO₂ инкубатор «SANYO» (Япония).

2.1.6 Критерии качества вакцины чумной живой

Согласно НД на производство вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций (ФСП 42-8654-07), производственная серия вакцины считается качественной при соответствии следующим критериям.

Физико-химические критерии. Вакцина должна представлять собой пористую массу серовато-белого цвета, при добавлении в ампулу 1,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида полностью растворяется в течение 3 мин. Растворенный препарат – гомогенная взвесь серовато-белого цвета без посторонних примесей и хлопьев, не должна расслаиваться в течение не менее 5 мин. рН готового препарата – от 6,8 до 7,8. Вакцинная суспензия свободно проходит в шприц через иглу № 0,8х40.

Состав. Вакцина должна содержать чистую живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, высушенную методом лиофилизации в стабилизирующей среде. В зависимости от концентрации и процента живых м.к. в ампуле содержится от 80 до 430 подкожных доз для взрослых в препарате, разлитом по 2 мл. Одна доза вакцины $(2,4-3,6) \times 10^8$ живых микробных клеток (м.к.) в 0,5 мл для подкожного введения взрослым,

или $(2,4-3,6) \times 10^8$ живых м.к. в 0,1 мл для внутрикожного введения, или $(2,4-3,6) \times 10^9$ живых м.к. в 0,15 мл для накожного скарификационного нанесения, или $(2,0-8,0) \times 10^6$ живых м.к. в 0,15 мл для ингаляционного введения.

Критерии качества. Процент живых м.к. в препарате вакцины должен быть не менее 25 %. Питательные агары, применяемые для определения количества живых м.к. в вакцине, должны обеспечивать рост чумных микробов штамма *Y. pestis* EV на всех чашках с агаром, засеянных 10 м.к. Концентрация м.к. в препарате, ресуспендированном в 1,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, должна находиться в пределах от 5×10^{10} до 1×10^{11} в 1 мл. Показатель термостабильности (срок, в течение которого в препарате сохраняется 50 % живых микробов по отношению к первоначальному числу при температуре хранения вакцины $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$), должен составлять не менее 4 сут. Для соответствия критериям иммуногенности ED₅₀ не должна превышать для морских свинок 1×10^4 , для белых мышей – 4×10^4 живых м.к.

При определении средней массы и однородности по массе коэффициент вариации массы вакцины в ампулах должен быть не более 5 %. Потеря в массе при высушивании составляет не более 4 %.

Герметизацию ампул проводят под вакуумом с предварительной оттяжкой капилляра. Газовая среда в ампулах должна давать бледно-голубое или розово-голубое свечение при определении в поле токов высокой частоты на аппарате типа Д`Арсенваль или Тесля.

Вакцина должна быть безопасной при подкожном введении морской свинке массой (275 ± 25) г 15×10^9 м.к./мл чумного микроба, не вызывать у животных потери массы более чем на 1/5 и видимых патологоанатомических изменений в легких, свойственных специфическому инфекционному процессу (кровоизлияний, очагов воспаления, гранулем, абсцессов). В месте введения допускается развитие кровоизлияния и инфильтрата подкожной клетчатки, в селезенке и печени – развитие ограниченной узелковой реакции.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Изучение физико-химических свойств гидролизатов и питательных сред

Физико-химические свойства гидролизатов и питательных сред (прозрачность, рН, содержание белка, пептидов, общего азота, аминного азота, сухого остатка, хлоридов, прочность геля) определяли в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

Внешний вид питательных сред оценивали визуально, при естественном освещении.

2.2.2 Оценка биологических показателей питательных сред

При оценке критериев пригодности плотных и жидких питательных сред по биологическим показателям (специфическая активность: показатели чувствительности, скорости роста, стабильности основных биологических свойств микроорганизмов) руководствовались МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» и МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

2.2.3 Оценка биологических показателей питательных сред в отношении вакцинного штамма *Y. pestis EV*

Подготовку вакцинного штамма проводили по ПР 01897080-09-16 «Промышленный регламент на производство вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций».

Культуру тест-штамма *Y. pestis* EV из ампулы пересевали в пробирку с бульоном Хоттингера (рН 7,2±0,1) и на чашку Петри с агаром Хоттингера (рН 7,2±0,1), инкубировали при температуре (27±1) °С в течение 48 ч. Выросшую на питательном агаре культуру проверяли визуально на чистоту роста и пересевали на скошенный в пробирках питательный агар. В случае отсутствия роста на питательной среде для последующего пассажа использовали культуру, выращенную на питательном бульоне. После инкубации посева при температуре (27±1) °С в течение 24 ч культуру использовали для контроля питательной среды.

Из суточной агаровой культуры тест-штамма *Y. pestis* EV готовили взвесь в 0,9 % растворе натрия хлорида (рН 7,1±0,1), концентрацией 1×10^9 м.к./мл по стандартному образцу мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России ОСО 42-28-85-соответствующего года выпуска (10 МЕ) и делали 10-кратные последовательные разведения, перенося 0,5 мл взвеси в 4,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида до разведения 10^{-7} (1×10^2 м.к./мл).

По 0,1 мл микробной взвеси тест-штамма *Y. pestis* EV из разведений 10^{-6} , 10^{-7} засеивали на чашки Петри с испытуемой питательной средой (по 3 чашки для соответствующего разведения тест-штамма) и на чашки Петри с контрольной средой, в качестве которой использовали заранее проверенную серию агара Хоттингера. Через 24 ч инкубации посевов при температуре (27±1) °С учитывали начальный рост чумного микроба, через 48 ч проводили окончательный учет.

2.2.4 Контроль стерильности питательных сред

Контроль стерильности осуществляли путем визуального просмотра каждой серии полученных сред после выдерживания при температуре (37±1) °С в течение 44-48 ч и последующих 14 сут при комнатной температуре.

2.2.5 Изучение показателя эффективности питательных сред

Питательная среда должна обеспечивать через 48 ч инкубации при температуре (28 ± 1) °С выход не менее 4 млрд. м.к. тест-штамма *Y. pestis* EV с 1 мл питательной среды.

Эффективность (Σ) среды для получения биомассы определяли по формуле:

$$\Sigma = \frac{V_1 \times C}{V_2}, \text{ где:} \quad (1)$$

V_1 – объём смытой бактериальной суспензии (мл);

C – количество микробных клеток в 1 мл суспензии;

V_2 – объём питательной среды.

2.2.6 Определение жизнеспособности микробных клеток в вакцине

Жизнеспособность м.к. в вакцине определяли культуральным методом согласно ФСП 42-8654-07 на вакцину чумную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения и ингаляций. Оптическую концентрацию находили в соответствии с «Инструкцией по применению отраслевого стандартного образца для визуального определения мутности бактериальных взвесей, стеклянного (ОСО 42-28-85-соответствующего года выпуска)», 10 МЕ которого эквивалентны 1×10^9 м.к. чумного микроба.

Определение количества живых м.к. проводили для каждого образца путем посева на чашки с питательным агаром. Содержимое каждой ампулы ресуспендировали в 1,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, делали последовательные десятикратные разведения этим же раствором от 10^{-1} до 10^{-8} . Из двух последних разведений 10^{-7} и 10^{-8} высевали по 0,1 мл взвеси на 3 чашки с агаром. Учет результатов проводили через 48 ч выдерживания посевов при температуре (27 ± 1) °С.

Процент живых м.к. вычисляли путем соотношения числа выросших колоний к показателю оптической концентрации, по формуле:

$$\% \text{ живых м.к.} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \times 100 \%, \text{ где} \quad (2)$$

БК – количество живых м.к. в 1 мл;

ОК – общая концентрация.

После определения процента живых микробов в трех образцах рассчитывали среднюю арифметическую, которую принимали за жизнеспособность м.к. в данной серии вакцины.

2.2.7 Подготовка вирулентного штамма

Лиофилизированную культуру вирулентного штамма *Y. pestis* 231 растворяли в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, высевали в пробирки со скошенным агаром Хоттингера (I пассаж) и инкубировали при температуре $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Далее делали пересев в пробирки со скошенным агаром Хоттингера и инкубировали при температуре $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ (II пассаж). Через 24 ч инкубации готовили в 0,9 % растворе натрия хлорида взвесь *Y. pestis* 231 концентрацией 10 МЕ по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-85-соответствующего года выпуска), эквивалентного 10 МЕ.

2.2.8 Определение иммуногенности вакцины

Иммуногенность полученных серий вакцины чумной живой определяли в соответствии с ФСП 42-8654-07 на вакцину чумную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. Морских свинок и белых мышей иммунизировали дозами 8×10^2 , 4×10^3 , 2×10^4 и 1×10^5 живых м.к. Вакцину вводили подкожно морским свинкам в объеме 0,5 мл, мышам – в объеме 0,2 мл. Заражение животных проводили на 21 сут после вакцинации, вводя подкожно 200 DcI вирулентного штамма чумного микроба *Y. pestis* 231. Контрольным животным вводили по 1 DcI вирулентного штамма. Наблюдение за животными вели в

течение 21 сут со дня заражения, контрольные животные должны погибнуть от чумы в течение 10 сут.

Иммуногенность вакцин оценивали по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева (1962) и выражали показателем ED₅₀, рассчитанным по формуле:

$$\text{Lg ED}_{50} = \text{lgD}_N - \delta (\sum \text{Li} - 0,5), \text{ где} \quad (3)$$

D_N – максимальная из используемых доз;

δ - логарифм кратности использованных разведений;

Li – отношение числа животных, выживших после заражения данной дозой к общему числу животных, которым эта доза была введена;

0,5 – постоянный коэффициент при сравнении.

2.2.9 Определение пирогенности

Пирогенные свойства готового препарата чумной вакцины изучали по методике, описанной в ГФ XIII, на здоровых кроликах весом 1,5-2,5 кг. В течение 3 сут (по 1 разу), а затем в день постановки эксперимента за 30 мин до введения исследуемого материала и через 1, 2, 3 ч после введения у каждого животного измеряли температуру тела. Во время опыта кроликов содержали в стационарных условиях с постоянной температурой (16-18) °С окружающей среды. Экспериментальную вакцину ресуспендировали апиrogenным 0,9 % раствором натрия хлорида и инъецировали 3 животным в краевую вену уха в объеме 1 мл - 300 млн. живых м.к. (1 доза). Контрольным кроликам вводили по 1 мл производственной серии вакцины чумной живой, тиомочевинную среду и разводящую жидкость (0,9 % раствор натрия хлорида) (по 1 мл 3 животным в каждой группе). Апиrogenным считали препарат, если ни у одного из 3 кроликов ни при одном из 3 определений (через 1, 2, 3 ч) максимальный подъем температуры не превышал 0,6 °С, а ее сумма для 3 животных – 1,4 °С.

2.2.10 Определение специфической безопасности

Определение специфической безопасности вакцины проводили на морских свинках массой (275 ± 25) г введением под кожу бедра 15×10^9 м.к. чумного микроба в объеме 1 мл. На 6 сут после введения вакцины свинку взвешивали (потеря массы тела не должна превышать $1/5$), подвергали эвтаназии, отмечали патологоанатомические изменения, обнаруживаемые при вскрытии. Вакцина не должна вызывать видимых патологоанатомических изменений в легких, свойственных специфическому инфекционному процессу (кровоизлияний, очагов воспаления, гранулем, абсцессов). В месте введения допускается развитие кровоизлияний и инфильтрата подкожной клетчатки, переходящих в некроз. Во внутренних органах допустимо развитие ограниченной узелковой реакции. Бактериологическому исследованию подвергали печень, селезенку, легкие, регионарные лимфатические узлы, кровь и ткани из места введения, которые засеивали методом отпечатков на 2 чашки Петри с плотной питательной средой pH $7,1 \pm 0,1$ (одну с агаром Хоттингера с добавлением натрия сернистокислого в концентрации 0,25 г на 1 л среды, вторую – с той же средой, но с добавлением генцианвиолета в концентрации 0,05 г на 1 л среды). Посевы выдерживали при температуре (27 ± 1) °С 2-3 сут. В посевах крови и легких не должно быть роста чумного микроба.

2.2.11 Определение потери в массе при высушивании

Потерю в массе при высушивании определяли гравиметрическим методом в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании».

2.2.12 Определение термостабильности

Определение проводят после 14 сут хранения серий вакцины при температуре (37 ± 1) °С.

Показатель термостабильности (срок, в течение которого в препарате сохраняется 50 % живых м.к. по отношению к первоначальному числу) рассчитывали согласно ФСП на препарат вакцины чумной по формуле:

$$T = \frac{0,3 \times 14}{\lg A_0 - \lg A_n}, \text{ где} \quad (4)$$

T - показатель термостабильности в сут;

0,3 – постоянная величина;

14 – срок хранения вакцины при температуре (37±1) °С в сут;

$\lg A_0$ – логарифм первоначального числа ж.м.к. в 1 мл;

$\lg A_n$ – логарифм числа ж.м.к. в 1 мл через 14 сут хранения вакцины при температуре (37±1) °С.

2.2.13 Оценка иммуногенности вакцины чумной живой с использованием антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* на белых мышях

Исследования методом проточной цитометрии осуществляли на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Beckman Coulter, США). Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения Cell Quest Pro. Пробоподготовка и настройка проточного цитофлуориметра проводилась согласно рекомендациям стандартизованной технологии исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови (Хайдуков С.В., 2013).

Кровь для исследования брали из сердца у интактных животных, а также у вакцинированных белых мышей на 7, 14 и 21 сут после иммунизации. Взятие крови в объеме 1,0-1,5 мл осуществляли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕС), и одобренных Комитетом по биомедицинской этике НИИ физиологии СО РАМН. Кровь от каждого животного вносили в пробирку с 50 мкл гепарина (5000 ЕД в 1 мл),

предварительно разведенного стерильной дистиллированной водой 1:10. Тщательно перемешивали, не допуская образования сгустков.

Техника постановки реакции. На одно исследование использовали две пластиковые пробирки (№ 1 и № 2) объемом 5 мл. В каждую пробирку вносили по 1000 мкл среды RPMI-1640 с 25 mM HEPES, пенициллина 20 ЕД/мл и добавляли по 50 мкл гепаринизированной крови. В пробирку № 1 вносили 50 мкл комплекса водорастворимых антигенов *Y. pestis* EV, в пробирку № 2 вносили 50 мкл 0,9 % раствора NaCl. Инкубировали 20 ч при температуре (37±1) °С в условиях повышенного содержания CO₂ (8±2 %). По окончании инкубации из каждой пробирки дозатором удаляли надосадочную жидкость в количестве 900 мкл. Из осадка по 25 мкл культуры клеток переносили в пробирки «Falcon» (объемом 5 мл) для проточного цитометра. В каждую пробирку добавляли 2 мкл моноклональных антител против CD25 лимфоцитов мыши. Инкубировали (в темноте) в течение 20 мин при температуре 20-22 °С, затем в каждую пробирку вносили по 500 мкл рабочего раствора для лизиса эритроцитов (основной лизирующий раствор разводят дистиллированной водой в 10 раз). Через 15 мин инкубации при 20-22 °С (контроль лизиса эритроцитов) центрифугировали при 250 g в течение 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 300 мкл Cell Wash (жидкость для разведения клеточной суспензии) и производили учет результатов с помощью программного обеспечения проточного цитометра.

2.2.14 Определение экспрессии рецепторов (CD25, HLA-DR) на поверхности лимфоцитов при антигенспецифической стимуляции *in vitro*

Взятие крови для исследований проводилось путем пункции локтевой вены в утренние часы натощак у людей, иммунизированных подкожно вакциной чумной живой из штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Обследуемый контингент подлежал ежегодной иммунизации против чумы по эпидемическим показаниям. Взятие крови осуществляли в следующие сроки: до вакцинации, на

7 и 21 сут, через 3, 6, 9 и 12 мес (срок наблюдения) после иммунизации. Все обследуемые давали информированное согласие на проведение настоящих исследований (согласно Федеральному закону «Об основах охраны здоровья граждан в РФ» от 21.11.2011 № 323-ФЗ).

Кровь забиралась в вакуумные пробирки, содержащие литиевую соль гепарина в качестве антикоагулянта.

Техника постановки реакции. Для проведения одного исследования использовали две пластиковые пробирки (№ 1 и № 2) объемом 5 мл. В каждую пробирку вносили по 300 мкл питательной среды RPMI-1640, пенициллин (из расчета 20 ЕД/мл) и добавляли по 100 мкл стабилизированной крови обследуемого. В пробирку № 1 вносили 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого, а в пробирку № 2 – 50 мкл комплекса водорастворимых антигенов *Y. pestis* EV. Пробирки инкубировали 20 ч при температуре (37 ± 1) °С в условиях повышенного содержания CO₂ (8 ± 2 %). По окончании инкубации супернатанты удаляли из каждой пробирки с помощью автоматического дозатора, а осадок в количестве 50 мкл переносили в пробирки «Falcon», (объемом 5 мл) для проточного цитометра. В каждую пробирку добавляли 2 мкл моноклональных антител против CD25 или HLA-DR лимфоцитов. После экспозиции 20 мин при температуре (21 ± 1) °С без доступа света в каждую пробирку вносили по 450 мкл рабочего раствора для лизиса эритроцитов. После 15 мин экспозиции при температуре (21 ± 1) °С (контроль лизиса эритроцитов), пробирки центрифугировали при 250 g 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 400 мкл Cell Wash (жидкость для разведения клеточной суспензии) и производили учет результатов с помощью программного обеспечения проточного цитометра.

2.2.15 Статистические методы

Статистическая обработка данных проводилась общепринятыми методами с вычислением среднеарифметической величины (M), ошибки в ее определении

(m) и степени достоверности различий средних арифметических (t) по критерию Стьюдента. Статистический анализ результатов исследования проводили с применением стандартных прикладных программ «Microsoft Office Excel», «Statistica». При попарном сравнении средних величин между группами использовался критерий Манна-Уитни. При сопоставлении результатов разницу считали достоверной, если максимальное значение доверительного интервала одной сравниваемой величины были меньше минимального значения другой. Достоверными считались различия при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Ранговый коэффициент корреляции Спирмена подсчитывали по формуле:

$$\rho = 1 - \frac{6 \cdot \sum d^2}{n(n^2 - 1)}, \text{ где} \quad (5)$$

$\sum d^2$ – сумма квадратов разностей рангов

n – число парных наблюдений.

ГЛАВА 3 Оценка эффективности применения питательной среды из ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного для культивирования вакцинного штамма чумного микроба

В биотехнологии производства вакцины чумной живой необходимы полноценные питательные среды, позволяющие получить достаточно большой объем биомассы вакцинного штамма *Y.pestis* EV и добиться необходимого показателя жизнеспособности.

По данным литературы, ранее изучалась возможность применения в процессе производства вакцины чумной живой сухой питательной среды Майского-Куцемакиной (1979), созданной на основе кукурузного экстракта. Но использование данной питательной среды для культивирования вакцинного штамма чумного микроба не увенчались успехом в связи с низким содержанием аминного азота. Так как кукурузный экстракт богат питательными веществами, для повышения уровня аминного азота К.С. Гюлушанян (1994) была предложена комбинированная питательная среда из кукурузного экстракта и казеина. На данный момент эта питательная среда включена в промышленный регламент производства вакцины чумной (ПР 01897080-09-16) для накопления биомассы вакцинного штамма наряду с агаром Хоттингера.

Недостатком первой среды, состоящей из гидролизатов кукурузного экстракта и казеина в отношении 1:2, является сложность приготовления, высокая стоимость и дефицит казеина; второй среды – ее дороговизна и нестабильность ростовых свойств. Вопрос возможности удешевления питательных сред остается открытым, так как замена мясного сырья может существенно влиять на рост биомассы.

Проведенные нами предварительные исследования по применению ростостимулирующих добавок в питательных средах показали, что наиболее перспективным стимулятором роста явилась соль Мора.

В наших экспериментах показано, что добавление в питательную среду, состоящую из моноосновы – ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного – соли Мора в сочетании с натрием сернистоокислым (регламентированный стимулятор роста), повышает ее ростовые свойства. Это позволяет исключить гидролизат казеина из состава среды, что приводит к значительному упрощению технологии изготовления и существенно снижает себестоимость как самой среды, так соответственно, и готового препарата вакцины чумной живой.

3.1 Разработка питательной среды на основе кукурузного экстракта сгущенного

В качестве исходного сырья для питательной основы использовали кукурузный экстракт сгущенный – побочный продукт крахмально-паточного производства, который является одним из перспективных источников азотсодержащих компонентов питательных сред – в сухом остатке содержится до 45 % азотистых веществ и до 25 % углеводов. Кроме того, он богат микроэлементами, содержание которых составляет (мг/кг): цинк – 22,00; марганец – 5,00; медь – 5,00; кобальт – 0,02; йод – 0,30; макроэлементами (%): фосфор – 0,25; натрий – 0,04; кальций – 0,59; калий – 0,36; магний – 0,12; сера – 0,11; хлор – 0,04. Содержание в кукурузном экстракте аминокислот составляет (%): аргинин – 90,00; гистидин – 72,00; лейцин – 72,00; изолейцин – 89,00; фенилаланин – 59,00; треонин – 95,00; валин – 12,70; лизин – 0,96; метионин – 0,56; триптофан – 0,22; метионин с цистином – 0,27; витаминов (мг/кг) – каротина (витамина А) – 8,0; В₁ – 4,0; В₂ – 1,0; В₃ – 6,5; В₄ – 400,0; В₅ – 17,0; В₆ – 2,9.

В качестве стимуляторов роста чумного микроба в рецептуру питательной среды добавляли соль Мора ($\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и натрий сернистоокислый (Na_2SO_3), а в качестве буферного соединения в состав среды вводили натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) –

неорганические соединения, обладающие буферным действием в физиологически важном диапазоне рН.

Технология приготовления ферментативного гидролизата из кукурузного экстракта сгущенного.

За основу технологии изготовления гидролизата взята общепринятая схема получения гидролизатов по Хоттингеру, включающая подготовку ферментного препарата, проведение непосредственно гидролиза и очистку полученной гидролизной массы путем фильтрации согласно ПР 01897080-09-16.

Кукурузный экстракт сгущенный из расчета 1 кг на 1,5 л дистиллированной воды кипятили в течение 5-10 мин, охлаждали до 46 °С и проводили коррекцию рН до значения 8,2-8,4 (40 % раствором натрия гидроокиси).

В остуженный настой добавляли поджелудочную железу крупного рогатого скота из расчета 80-100 г на 1,0 л и в качестве консерванта хлороформ до конечной концентрации 1,5 %.

Гидролиз проводили в течение 10 сут при температуре (37±2) °С и периодическом перемешивании. Ежедневно измеряли уровень аминного азота. После прекращения нарастания аминного азота (на 7-10 сут) перемешивание и подогрев останавливали. Гидролизат отстаивали при температуре (20±2) °С в течение 2 сут, затем жидкость отфильтровывали и разливали по бутылкам, добавляя 1,0 % хлороформа, плотно закрывали стерильными резиновыми пробками, этикетировали и хранили при температуре (4±2) °С.

Приготовление питательной среды из ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС).

Добавляли компоненты в следующих соотношениях, 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 сернистокислый	– 0,3 г
соль Мора	– 0,1 г
агар микробиологический	– 17,0 г
дистиллированная вода	– до 1 литра

Полученный гидролизат разводили дистиллированной водой из расчета содержания в готовом продукте $(0,12 \pm 0,4)$ % аминного азота.

Среду кипятили до полного растворения ингредиентов и остужали до $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем добавляли стимуляторы (натрий сернистокислый, соль Мора) и с помощью 20 % раствора натрия гидроокиси устанавливали pH $7,2 \pm 0,1$.

Питательную среду, разлитую во флаконы или матрацы, стерилизовали в автоклаве при $(120 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,5 атм в течение 30 мин, затем охлаждали и выдерживали в условиях термостата при температуре $(37 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 48 ч для контроля стерильности.

В ходе эксперимента аналогично готовили другой вариант 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), приготовленную по одному и тому же рецепту, контролировали в трехкратном повторе по физико-химическим и биологическим показателям. Физико-химический контроль питательной среды осуществляли в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

Физико-химические показатели плотных питательных сред ГКЭС:

Оценку внешнего вида готовой питательной среды проводили визуально – полупрозрачный гель от светло-желтого до светло-коричневого цвета

pH, ед	–	$7,1 \pm 0,1$
Аминный азот, %	–	$0,12 \pm 0,4$
Хлориды (в пересчете на натрия хлорид), %	–	$0,5 \pm 0,1$
Прочность геля, г	–	$360,0 \pm 4,0$
Температура плавления, $^{\circ}\text{C}$	–	$85,0 \pm 2,0$
Температура застудневания, $^{\circ}\text{C}$	–	$36,0 \pm 5,0$

Биологический контроль качества питательных сред проводили согласно МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза». Контроль биологических свойств готовых питательных сред включает два этапа: качественный (определение ростовых свойств) и количественный контроль (стабильность основных свойств тест-штамма, эффективность и чувствительность среды).

Для проверки ростовых свойств среды из односуточной агаровой культуры тест-штамма *Y.pestis* EV готовили взвесь с концентрацией 1×10^9 м.к./мл. Полученную взвесь доводили последующим титрованием до разведений 10^{-7} и 10^{-8} , по 0,1 мл этой взвеси (100 и 10 м.к. соответственно) высевали на 3 чашки Петри с питательной средой и инкубировали при температуре (27 ± 1) °С в течение 48 ч.

Учет результатов проверки двух вариантов плотной питательной среды ГКЭС проводили путем подсчета выросших колоний. На питательной среде с добавленными стимуляторами, при посевной дозе 100 м.к. выросло в среднем 89 ± 7 колоний, при посевной дозе 10 м.к. – 9 ± 2 колоний диаметром 2,2 мм с хорошо выраженной кружевной зоной. На питательной среде без стимуляторов из 100 м.к. в среднем выросло 45 ± 3 колоний, при посевной дозе 10 м.к. – 3 ± 2 колонии, мелкие с диаметром 1,0-2,0 мм, со слабо выраженной кружевной зоной.

На жидкой питательной среде с добавлением соли Мора и натрия сернистокислого через 48 ч инкубации при температуре (27 ± 1) °С наблюдался агглютинативный рост в виде мелких хлопьев с рыхлым осадком на дне пробирки и с прозрачным столбиком бульона. В бульоне без стимуляторов рост не наблюдался (срок наблюдения 5 сут).

Определение чувствительности сред ГКЭС производили визуально. Через 48 ч инкубации посевов при температуре (27 ± 1) °С наблюдался рост в виде типичных колоний в R-форме с бугристым центром светло-коричневого цвета и «кружевной» периферией, диаметром 2,0-2,2 мм. Показатель стабильности

основных свойств тест-штамма при выращивании на испытываемой питательной среде определяли по отношению числа атипичных по морфологии колоний к общему числу выросших.

Таким образом, сконструированная питательная среда на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного с ростостимулирующими добавками – солью Мора и натрием сернистоокислым характеризуется простой технологией изготовления и малым числом компонентов. Результаты проведенных исследований показывали, что по физико-химическим и биологическим свойствам питательная среда ГКЭС полноценна по компонентному составу и эффективна при культивировании вакцинного штамма *Y.pestis* EV, что обеспечивает оптимальные условия для его выращивания.

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

В промышленном регламенте на производство вакцины чумной для накопления биомассы предусмотрено применение двух сред: агаровой из гидролизата говяжьего мяса по Хоттингеру и кукурузно-казеинового агара. В связи с этим, в дальнейших исследованиях были изучены физико-химические показатели разработанной экспериментальной среды в сравнении с регламентированными средами (Таблица 2).

При сравнительном изучении физико-химических показателей сконструированная питательная среда ГКЭС равноценна классическим средам.

Проведено сравнительное изучение регламентированных показателей качества полученных 18 серий препарата: 6 – с выращиванием на питательном агаре Хоттингера, 4 - на кукурузно-казеиновом агаре и 8 – на агаре ГКЭС (Таблица 3).

Таблица 2 – 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 среды	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

Таблица 3 – 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	98±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

Анализ полученных данных показал, что вакцина чумная живая, приготовленная с использованием экспериментальной питательной среды, полностью отвечает регламентированным нормам. При этом показатель жизнеспособности серий вакцины, приготовленной на агаре ГКЭС, в 1,3 раза выше, чем у серий, полученных на регламентированных питательных средах ($p \leq 0,05$). Помимо этого, серии, полученные на среде ГКЭС, отличаются

повышением показателя термостабильности, что говорит об оптимально подобранной питательной среде, которая способствует сохранению живых микробных клеток при хранении препарата.

При сравнении стоимости питательных сред, приготовленных из различного сырья, выявлено, что стоимость среды ГКЭС меньше, чем агара Хоттингера в 3,5 раза; кукурузно-казеинового агара – в 2,3 раза. Таким образом, использование питательной среды ГКЭС взамен регламентированных сред позволит повысить качество и существенно снизить себестоимость конечной продукции.

3.3 Апробация питательной среды ГКЭС для масштабированного производства вакцины чумной живой

Сконструированная питательная среда ГКЭС была использована как накопительная для выращивания вакцинного штамма чумного микроба аппаратным методом (АКМ-Ш) на плотной питательной среде в производственных условиях. Контроль осуществляли на всех технологических этапах изготовления, включая готовый препарат, в соответствии с утвержденной нормативной документацией.

После 48 ч выращивания микробной массы при температуре $(27 \pm 1) ^\circ\text{C}$ смыв с АКМ-Ш проводили двукратно средой высушивания (сахарозо-желатиновая с тиомочевинной), в соответствии с промышленным регламентом. Таким образом, в ходе эксперимента было проведено пять технологических циклов, где на этапе смыва из полученных биомасс вакцинного штамма отбирали пробы для определения оптической и биологической концентрации (Таблица 4).

Качество питательной среды оценивали по выходу микробной массы. Среднее количество бакмассы, полученной с 1 мл среды, составило $4,7 \pm 0,3$ млрд. м.к./мл. Питательная среда считается пригодной для производства биомассы чумного микроба при показателе эффективности не менее 4 млрд. м.к. с 1 мл среды.

Таблица 4 – Качественные характеристики биомассы вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV (среда ГКЭС) на этапе смыва

АКМ-Ш		Концентрация микробных клеток		Выход с 1 мл питательной среды, млрд м.к./мл
		Количество микробных клеток, млрд/мл	Живых микробных клеток, %	
Опыт 1	Смыв 1	110	96,7	5,2
	Смыв 2	25	82,0	
Опыт 2	Смыв 1	85	94,7	4,9
	Смыв 2	30	94,1	
Опыт 3	Смыв 1	60	96,2	4,0
	Смыв 2	50	103,0*	
Опыт 4	Смыв 1	90	78,8	4,3
	Смыв 2	50	61,0	
Опыт 5	Смыв 1	100	109,0*	5,0
	Смыв 2	25	84,9	
M±m		62,5±11,8	90,0±4,7	4,7±0,3

* значение показателя, превышающее 100 %, входит в 20 % допускаемой методом погрешности.

Таким образом, данная питательная среда на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного обеспечивает высокий уровень роста биомассы вакцинного штамма.

На этапе розлива (фасовки) полуфабриката вакцины чумной живой контролируют такие показатели, как процент живых м.к. в биомассе и оптическую концентрацию. Средний процент жизнеспособных клеток составил $61,6 \pm 5,7$ (Таблица 5).

Таблица 5 – Качественные характеристики экспериментальных серий вакцины чумной живой (среда ГКЭС) на этапе розлива

Серия	Концентрация микробных клеток	
	Количество микробных клеток, млрд/мл	Живых микробных клеток, %
1	80	77,8
2	90	66,6
3	85	69,2
4	95	80,8
5	50	50,1
6	85	36,4
7	75	55,7
8	75	56,5
M±m	76,3±5,3	61,6±5,7

Разлитые по ампулам экспериментальные образцы замораживали и лиофилизировали по регламентированной методике.

Всего было получено 8 экспериментальных серий, проверенных на соответствие требованиям нормативной документации, а именно: специфическая стерильность вакцины (отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов), оптическая и биологическая концентрация (жизнеспособность), термостабильность, потеря в массе при высушивании, специфическая безопасность, иммуногенность. При этом наблюдалось закономерное снижение биологической концентрации в сериях на каждом биотехнологическом этапе, в том числе и после лиофилизации. Основные показатели качества полученной вакцины представлены в таблице.

Во всех экспериментальных сериях вакцина чумная живая представляла собой пористую массу серовато-белого цвета, растворяющуюся в течение 3 мин в 0,9 % растворе натрия хлорида с образованием гомогенной взвеси.

Таблица 6 – Характеристика основных показателей качества экспериментальных серий вакцины чумной живой (среда ГКЭС)

Серия	Показатели качества			
	Оптическая концентрация, млрд/мл	Жизнеспособность, %	Термостабильность, сут	Потеря в массе при высушивании, %
1	75	68,2	13,5	1,3
2	80	44,3	5,8	0,2
3	78	45,6	10,6	0,8
4	90	53,0	13,3	0,7
5	50	42,1	9,2	1,7
6	80	27,6	22,0	1,2
7	70	32,6	9,7	1,3
8	70	34,4	4,5	0,8
M±m	74,1±4,1	43,5±4,9	10,9±2,0	1,1±0,1

Морфология бактерий в мазках, а также посевы на плотных и жидких питательных средах были типичны для чумного микроба. При этом на агаре через 48 ч инкубации при температуре (27±1) °С культура чумного микроба вырастала в виде круглых колоний в R-форме с бугристым центром светло-коричневого цвета и «кружевной» периферией, средний размер колоний 2,3±0,5 мм.

Полученные серии вакцины чумной живой по показателю «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов» соответствовали нормированному критерию.

Потеря в массе при высушивании (остаточная влажность) в разных сериях вакцины определялась в пределах от 0,2 до 1,7 %, при норме не более 4,0 %.

Жизнеспособность вакцины непосредственно после лиофилизации находилась в пределах, регламентированных для производственных серий (не менее 25,0 %), и составила в среднем $43,5 \pm 4,9$ %.

Величина термостабильности также соответствовала регламентированным нормам во всех сериях (при нормируемом показателе не менее 4 сут).

Реактогенность определяли по совокупным данным специфической безопасности и пирогенности вакцины согласно ГФ.

Проверка специфической безопасности полученных серий вакцины чумной живой была проведена на 8 морских свинках. При подкожном введении вакцины в дозе 15×10^9 м.к. в 0,5 мл раствора натрия хлорида на 6 сут видимых патологоанатомических изменений не выявлено, у всех подопытных животных отмечено образование инфильтратов, небольших кровоизлияний в месте введения вакцины, увеличение регионарных лимфатических узлов. У двух из восьми морских свинок наблюдалась ограниченная узелковая реакция в селезенке и печени. Ни одна из экспериментальных серий вакцины не вызывала гибели животного или потери веса больше, чем на 1/5, что свидетельствует о безопасности препарата.

Пирогенные свойства вакцинных препаратов изучали по методике ГФ РФ ОФС.1.2.4.0005.15 «Пирогенность». Данные суммарного подъема температуры ($1,2 \pm 0,6$ °С) у кроликов показывали, что вакцина чумная живая, приготовленная на основе кукурузного экстракта, не вызывала выраженной пирогенной реакции.

Что касается иммуногенных свойств, то данный показатель регистрировался на высоком уровне как для белых мышей, так и для морских свинок. Величина ED₅₀ для белых мышей составила 10647 живых м.к., что не превышала

регламентированную норму 4×10^4 ж.м.к. Для морских свинок показатель ED₅₀ также был не более допустимого (1×10^4 ж.м.к.) – 5593 ж.м.к.

Проанализированные данные позволили сделать вывод о том, что вакцина чумная живая, приготовленная на питательной среде из ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, по всем исследованным свойствам (культурально-морфологические, специфическая активность, потеря в массе при высушивании, термостабильность, специфическая безопасность, иммуногенность) соответствовала требованиям нормативной документации.

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

ГЛАВА 4 Оптимизация технологии приготовления полуфабриката микробной взвеси вакцинного штамма с целью повышения жизнеспособности вакцины чумной живой

Повышение качества и стандартизация вакцинного препарата являются главными задачами при его совершенствовании. Оптимизация отдельных этапов приготовления вакцины чумной живой при неизменности самих биотехнологических стадий одно из основных направлений по улучшению конечных показателей ее качества.

В производстве вакцины используется технология синхронизации биомассы после смыва путем выдерживания ее при температуре (4 ± 2) °С в течение 48 ч, при этом происходит накопление клеток, находящихся в стационарной фазе роста как наиболее устойчивых.

В соответствии с промышленным регламентом производства 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.

В связи с этим наши исследования были направлены на создание идентичных условий в процессе синхронизации всех клеток взвеси с целью стабилизации конечных показателей качества чумной вакцины путем объединения двух смывов до этапа розлива (метод объединенного смыва).

4.1 Совершенствование этапа приготовления вакцинной взвеси

Биотехнология производства препарата вакцины чумной живой построена на последовательном выполнении регламентированных этапов производственного цикла (Рисунок 1).

Рисунок 1 – Технологические этапы производства вакцины чумной живой



Выращенную в АКМ-III на плотной питательной среде биомассу смывают стабилизатором – средой высушивания (10 % сахарозы, 1 % тиомочевины и 1 %

желатина). В соответствии с промышленным регламентом для увеличения количества биомассы смыв с АКМ-Ш проводят двукратно, получая при этом две последовательно смытые вакцинные суспензии. Первичный (основной) смыв по густоте значительно превышает повторный, при этом оптическая концентрация м.к. в первой смытой емкости составляет 90-120 млрд. м.к./мл, а во второй всего 20-30 млрд. м.к./мл. Далее полученные бакмассы выдерживают при температуре (4 ± 2) °С 48 ч, после чего проводят первичный учет контрольных посевов смытой бактериальной суспензии на отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. За время выдерживания биомассы в условиях пониженной температуры происходит процесс синхронизации – накопление микроорганизмов, находящихся в стационарной фазе роста, как наиболее устойчивых. Вакцина, прошедшая синхронизацию, наиболее стабильна при дальнейшей фасовке (розливе по ампулам) и лиофилизации.

В суспензии (первичной) с большей густотой содержится меньшее количество стабилизирующей среды на микробную клетку, а содержание продуктов метаболизма и распада отмерших клеток – относительно повышено. Во второй емкости достигнуто более адекватное соотношение действующих компонентов стабилизатора с количеством взвешенных в нем клеток вакцинного штамма, что доказано многочисленными исследованиями.

Для стандартизации качества полученной биомассы и произведенной из нее вакцины очевидна целесообразность унификации условий синхронизации, то есть объединение двух микробных взвесей в одну непосредственно после смыва, что может способствовать получению более жизнеспособного и стандартизированного препарата вакцины чумной живой.

С целью подтверждения этого предположения «методом объединенного смыва» в течение трех технологических циклов изготовлены пять экспериментальных серий, которые были исследованы по основным регламентированным показателям качества препарата. Четыре контрольные серии были получены традиционным методом и исследованы по тем же параметрам.

В ходе эксперимента были получены три образца биомассы вакцинного штамма чумного микроба (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Получение биомасс вакцинного штамма *Y. pestis* EV

Все микробные взвеси выдерживали при температуре (4 ± 2) °С в течение 48 ч. Было отмечено, что биологическая концентрация полученных микробных суспензий (процент живых м.к.) уменьшается за время синхронизации, при этом наибольшее снижение наблюдалось в микробных взвесах с максимальной густотой смыва. По завершению процесса синхронизации для получения технологической серии, в соответствии с регламентом, содержимое двух смывов объединяли, доводили до требуемой концентрации (40-100 млрд. м.к./мл) средой высушивания и фасовали по ампулам (Таблица 7).

На этапе приготовления вакцинной взвеси технологическая серия может делиться на несколько товарных серий. Товарная серия – совокупность ампул, разлитых из одной технологической емкости (имеющие идентичные условия на этапах розлива и лиофилизации). Таким образом, микробная взвесь, приготовленная «методом объединенного смыва», уже готова для этапа розлива.

Таблица 7 – Параметры экспериментальных и контрольных серий вакцины чумной на этапе розлива

Серии	№	Количество микробных клеток, млрд/мл	Живых микробных клеток, %
Экспериментальные	1	75	56,4±0,9
	2	70	77,6±1,6
	3	70	77,3±1,8
	4	65	62,2±2,6
	5	65	62,0±2,1
M±m		69,0±2,09	67,1±4,9
Контрольные	1	75	49,2±1,6
	2	30	72,1±3,3
	3	98	54,2±2,7
	4	90	58,4±1,9
M±m		73,3±7,5	58,5±5,7

Далее приготовление производственных (контрольных) и экспериментальных серий вакцины чумной живой проходило по схеме технологического процесса.

4.2 Анализ показателей качества полученного препарата при использовании метода объединенного смыва

Разлитые по ампулам экспериментальные и контрольные образцы лиофилизировали по регламентированной методике. Качество полученных серий вакцины было исследовано по основным показателям: жизнеспособность, термостабильность, отсутствие посторонних бактерий и грибов (метод прямого посева), потеря в массе при высушивании (гравиметрический метод) (Таблица 8).

Рассматривая полученные результаты следует отметить, что все серии соответствовали основным регламентированным нормам.

Таблица 8 – Сравнительные показатели качества экспериментальных и контрольных серий вакцины чумной живой после лиофилизации

Серии	№	Оптическая концентрация, млрд/мл	Жизнеспособность, %	Термостабильность, сут	Потеря в массе при высушивании, %
Экспериментальные	1	70	41,0±2,3	11,0	1,6
	2	70	43,6±1,1	23,4	1,5
	3	65	38,4±3,2	13,5	1,9
	4	65	56,3±1,0	19,3	1,6
	5	60	50,1±0,9	15,5	1,8
M±m		66,0±2,1	45,9±3,6	16,5±2,5	1,7±0,1
Контрольные	1	70	31,1±2,2	10,2	1,7
	2	30	33,8±2,4	10,3	1,5
	3	75	28,3±3,1	12,1	2,0
	4	65	45,1±4,1	14,1	2,0
M±m		60,1±0,9	34,6±4,3	11,7±1,1	1,8±0,1

Отмечено, что показатель жизнеспособности в экспериментальных сериях вакцины, полученных «методом объединенного смыва», непосредственно после лиофилизации был достоверно выше (45,9±3,6 %) по сравнению с контрольными сериями (34,6±4,3 %) ($p \leq 0,05$).

Показатель иммуногенной активности, то есть способность создавать длительный (до 1 года) и достаточный по напряженности иммунитет, для вакцины чумной живой измеряется в ED₅₀ и не должен превышать 1×10⁴ живых м.к. для морских свинок и 4×10⁴ живых м.к. для белых мышей.

Показатель иммуногенности определяли для экспериментальных серий № 3; 5 и для контрольной серии № 4 (таблица 9).

Таблица 9 – Сравнительная оценка показателей иммуногенности вакцины чумной живой

Серия	ED ₅₀ , ж.м.к.	
	для белых мышей	для морских свинок
Экспериментальная № 3	18640	6211
Экспериментальная № 5	15569	7493
Контрольная серия № 4	17845	7979

Показатель иммуногенности ED₅₀ как в экспериментальных, так и в контрольной серии соответствовал регламентированным нормам, что говорит об иммунологической эффективности препарата.

Таким образом, проведенные исследования показали, что усовершенствование биотехнологии приготовления микробной взвеси вакцинного штамма путем совмещения смыва и сведения бакмассы в один прием («метод объединенного смыва») позволяет улучшить качество конечного продукта по показателю жизнеспособности. Полученные данные стали основанием для внедрения модифицированного этапа смыва в производственный процесс приготовления вакцины чумной живой в Промышленный регламент.

4.3 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 транспортировки в условиях «холодовой цепи». Основополагающим фактором для живой вакцины является количество жизнеспособных клеток, которое определяет число доз в ампуле. Для изучения стабильности препарата, полученного «методом объединенного смыва», был проведен мониторинг жизнеспособности экспериментальных и коммерческих (контрольных) серий через различные промежутки времени его хранения.

Известно, что наибольшее снижение процента жизнеспособности приходится на первые 2-3 месяца после изготовления чумной вакцины. Проведенные исследования показали, что в течение первых трех месяцев происходило закономерное незначительное снижение количества живых м.к. в препарате, жизнеспособность экспериментальных серий снизилась в среднем на 2,2 %, а контрольных – на 2,7 %, но эти различия статистически не значимы ($p \leq 0,05$) (Таблица 10).

Таблица 10 – Оценка жизнеспособности экспериментальных серий вакцины чумной живой на ранних сроках хранения препарата

Серия	Оптическая концентрация, млрд/мл	Жизнеспособность, %						
		На дату выпуска	Срок хранения					
			7 сут	14 сут	21 сут	30 сут	60 сут	90 сут
Экспериментальная вакцина								
№ 1	70	41,0±2,3	41,1±2,2	40,9±1,1	40,1±3,4	39,7±0,9	39,0±1,4	38,8±1,1
№ 2	70	43,6±1,1	43,0±3,3	43,1±2,6	42,8±3,8	42,5±4,1	42,3±1,8	42,4±3,0
№ 3	65	38,4±3,2	37,9±2,7	37,8±1,4	36,6±2,3	36,0±1,7	36,2±3,7	35,7±2,0
№ 4	65	56,3±1,0	56,1±4,0	55,5±2,0	55,1±1,1	53,5±3,4	53,6±1,0	53,5±0,7
№ 5	60	50,1±0,9	50,2±2,9	48,9±2,6	49,1±2,9	48,5±3,3	48,4±1,9	48,1±3,3
M±m	-	45,9±3,3	45,7±3,3	45,2±3,1	44,7±3,3	44,0±3,1	43,9±3,2	43,7±3,2
Контрольная вакцина								
№ 1	70	31,1±2,2	31,0±0,8	28,8±3,0	28,9±1,4	28,5±2,3	27,9±3,7	28,0±2,0
№ 2	30	33,8±2,4	33,5±3,3	33,0±4,1	32,0±1,9	32,0±3,6	31,6±2,1	31,1±3,3
№ 3	75	28,3±3,1	28,2±1,5	27,9±1,9	27,0±3,3	26,5±1,5	26,6±1,4	26,3±2,9
№ 4	65	45,1±4,1	45,0±1,6	44,4±3,7	43,5±2,6	42,5±1,1	42,4±3,3	42,2±1,3
M±m	-	34,6±3,7	34,4±3,7	33,5±3,8	32,9±3,7	32,4±3,6	32,1±3,6	31,9±3,6
t	-	2,28	2,28	1,84	2,38	2,44	2,46	2,46

Мониторинг стабильности при длительном хранении показал, что во все исследованные сроки (через 1, 2, 3 года) жизнеспособность экспериментальных серий препарата была выше, чем в контрольных (Таблица 11).

Таблица 11 – Показатели жизнеспособности экспериментальных и контрольных серий вакцины чумной живой в процессе хранения при температуре (4±2) °С

Серии	Жизнеспособность, %			
	На дату выпуска	Срок хранения		
		1 год	2 года	3 года
Экспериментальная вакцина				
№ 1	41,0±2,3	38,5±3,0	37,9±3,1	35,5±0,9
№ 2	43,6±1,1	42,2±2,3	42,0±1,6	40,4±3,5
№ 3	38,4±3,2	35,3±2,4	35,1±3,0	32,8±0,6
№ 4	56,3±1,0	52,2±3,3	53,0±0,9	50,2±3,8
№ 5	50,1±0,9	48,4±3,0	47,7±1,1	45,6±3,5
M±m	45,9±3,3	43,3±3,1	43,1±3,3	40,9±3,4
Контрольная вакцина				
№ 1	31,1±2,2	27,4±2,5	26,7±2,9	25,1±0,7
№ 2	33,8±2,4	30,5±2,5	29,0±3,4	25,6±0,3
№ 3	28,3±3,1	25,7±0,8	25,3±2,4	24,8±0,2
№ 4	45,1±4,1	42,1±4,1	41,1±2,2	37,7±3,4
M±m	34,6±3,7	31,4±3,7	30,5±3,6	28,3±3,6
t	2,28	2,48	2,57	2,57

При сравнительном анализе показателей жизнеспособности в пределах каждой группы (срок хранения) четко регистрируется преимущество вакцины, полученной «методом объединенного смыва» ($t=2,37$).

Как следует из полученных результатов, через один год хранения вакцины, полученной «методом объединенного смыва», процент жизнеспособности снизился в среднем на 2,6 %, а к окончанию срока годности препарата - еще на 2,4 %. Анализ результатов показал, что всего за три года жизнеспособность вакцины упала на 5,0 % (по сравнению с исходной), тогда как в контроле этот показатель снизился на 6,3 % (различия статистически не значимы $p \leq 0,05$).

Следует отметить, что за время хранения вакцины (экспериментальной и контрольной) ни в одном случае не произошло уменьшения жизнеспособности ниже регламентированного уровня в 25 %.

Проведенные исследования показывают, что препарат вакцины чумной живой, полученный «методом объединенного смыва», сохраняет стабильность регламентированных показателей в течение всего срока годности и имеет хорошие показатели жизнеспособности при длительных сроках хранения (тенденцию к стабилизации жизнеспособности), что подтверждает целесообразность использования данной методики в промышленном производстве препарата.

ГЛАВА 5 Применение антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки качества препарата вакцины чумной живой

Иммунологическая активность – одна из основных характеристик вакцины, отражающая ее профилактическую эффективность. Контроль качества производственных серий вакцины против чумы проводится в соответствии с нормативной документацией на препарат (ПР, ФСП) и предписывает проведение иммунизации и последующее заражение лабораторных животных.

Недостаток регламентированного метода оценки иммуногенности вакцины чумной живой – это необходимость длительного (21 день) содержания зараженных возбудителем чумы животных в специальных условиях, обеспечивающих соблюдение требований биобезопасности при работе с ПБА I-II групп, и связанная с этим потенциальная опасность работ с вирулентным штаммом чумного микроба.

Нами проведены исследования по изучению возможности применения клеточного антиген-стимулированного теста *in vitro* (КАСТ) для контроля иммуногенной активности производственных серий вакцины чумной живой.

Учитывая ведущую роль клеточного иммунитета в формировании и реализации противочумного иммунитета, изучена возможность оценки иммунного ответа с использованием метода КАСТ, основанного на выявлении маркеров активации лимфоцитов при стимуляции специфическим антигеном (комплекс водорастворимых антигенов *Y. pestis* EV, который получали комплексным методом: водно-солевой экстракцией, ультразвуковой дезинтеграцией, осаждением белковых фракций сульфатом аммония по методу Е.Н. Афанасьева (1986)).

Анализируя маркеры ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации лимфоцитов определяли интенсивность антигенреактивности лимфоцитов в клеточных тестах *in vitro*.

5.1 Оценка клеточного звена иммунитета у лабораторных животных вакцинированных чумной вакциной с использованием метода антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* (КАСТ)

В качестве биомодели использовали белых лабораторных мышей, которых распределяли на 4 группы по 30 особей в каждой. Иммунизировали коммерческим препаратом вакцина чумная живая из штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ в дозах – 8×10^2 , 4×10^3 , 2×10^4 и 1×10^5 живых м.к., подкожно в объеме 0,2 мл. Взятие крови осуществляли до вакцинации и на 7, 14, 21 сут после иммунизации.

В ходе эксперимента интенсивность антигенреактивности Т-лимфоцитов определяли в клеточных тестах *in vitro*, анализируя количество CD25 лимфоцитов с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител, при воздействии комплексом водорастворимых антигенов *Y. pestis* EV (BrAg). Постановка реакции осуществлялась в течение 24 ч после взятия крови у животных.

В контрольной пробе с целью выявления возможной спонтанной активации лимфоцитов клетки инкубировали со стерильным 0,9 % изотоническим раствором натрия хлорида.

В результате проведенных исследований установлено, что у интактных белых мышей количество лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации при воздействии комплексом водорастворимых антигенов *Y. pestis* EV (BrAg), составило $4,33 \pm 0,51$ %, при воздействии 0,9 % раствором натрия хлорида – $3,82 \pm 0,38$ %. Следует отметить, что во все периоды обследования спонтанной активации лимфоцитов не зафиксировано.

На 7, 14 и 21 сут у животных, иммунизированных вакциной против чумы, дозой 8×10^2 живых м.к., содержание лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD25, после стимуляции клеток комплексом водорастворимых антигенов оставалось на уровне контрольных значений.

У биомоделей, иммунизированных дозой 4×10^3 живых м.к., на 14 сут количество лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации, после

стимуляции антигеном повышалось и составляло $33,53 \pm 4,88$ %. У животных, иммунизированных дозой 2×10^4 живых м.к., количество антигенстимулированных клеток на 14 сут составляло $39,28 \pm 6,58$ %, на 21 сут – $16,37 \pm 3,35$ %.

При иммунизации самой высокой дозой – 1×10^5 живых м.к. – увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD25 в условиях стимуляции ВрАг, отмечалось на 7, 14 и 21 сут, в среднем до $12,09 \pm 1,20$ %; $56,88 \pm 5,84$ % и $24,91 \pm 2,23$ %, что статистически значимо выше контрольного значения $4,33 \pm 0,51$ ($p \leq 0,05$).

Анализ полученных данных свидетельствует, что у животных, вакцинированных дозами 4×10^3 , 2×10^4 и 1×10^5 живых м.к., наивысший уровень экспрессии лимфоцитами маркера активации при антигенной стимуляции *in vitro* регистрировался на 14 сут после иммунизации (Рисунок 3).

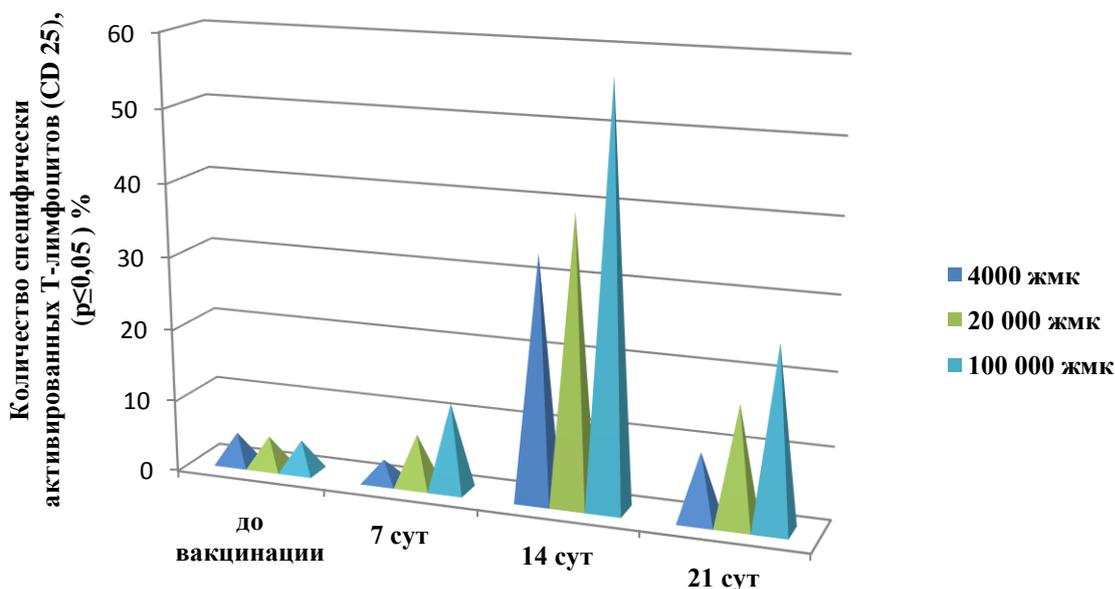


Рисунок 3 – Динамика количества специфически активированных лимфоцитов (CD25-позитивных) в крови у животных из групп сравнения

Для определения возможности применения данной методики в качестве контроля протективного действия вакцины против чумы проводили сравнительное изучение уровня интенсивности экспрессии маркера ранней

активации и наличия поствакцинального иммунитета, определяемого по показателю ED₅₀.

На 21 сут после иммунизации (срок формирования поствакцинального иммунитета против чумы) для подтверждения напряженности иммунитета животных каждой группы заражали подкожно 200 Dc1 вирулентного штамма *Y. pestis* 231. По регламентированной методике через 21 сут после заражения рассчитывали ED₅₀ по формуле.

На основе полученных данных проводили сравнение количества выживших в опыте животных с повышением уровня лимфоцитов, экспрессирующих антигенспецифические рецепторы CD25, рассчитывая коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Установлена высокая степень прямой связи (коэффициент корреляции $r = 1,000$) количества выживших животных с увеличением уровня лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации. Полученные данные по количеству выживших животных в каждой группе вакцинированных коррелируют с изменением количества CD25 позитивных лимфоцитов (Таблица 12).

Таблица 12 – Сравнительная оценка показателей иммуногенности вакцины чумной живой

Доза иммунизации, живых м.к.	Лимфоциты, экспрессирующие CD25, %				Определение иммуногенности вакцины чумной живой с использованием биопробы		
	До вакцинации	ч/з 7 сут после вакцинации	ч/з 14 сут после вакцинации	ч/з 21 сут после вакцинации	Количество животных в опыте	Количество выживших животных	ED ₅₀ , живых м.к.
800	4,33±0,51	3,58±0,24	4,29±0,52	3,91±0,70	6	0	13420
4 000		3,04±0,82	33,53±4,88	9,40±2,11	6	1	
20 000		7,17±0,95	39,28±6,58	16,37±3,35	6	3	
100 000		12,09±1,20	56,81±5,84	24,91±2,23	6	6	

В результате исследования было выявлено, что при воздействии комплекса антигенов чумного микроба *in vitro* на лимфоциты иммунизированных против чумы биомоделей наблюдается статистически значимое ($p \leq 0,05$) усиление

экспрессии маркера ранней активации – CD25. Экспериментально установлено, что интенсивность антигенреактивности лимфоцитов четко коррелирует с иммунизирующей дозой. При увеличении концентрации живых микробных м.к. *Y. pestis* EV во вводимой вакцине в крови у животных отмечается пропорциональное повышение количества CD25-позитивных лимфоцитов после стимуляции ВpAg в условиях *in vitro*.

В целом, проведенные исследования продемонстрировали возможность и перспективу применения клеточного антиген-специфического теста *in vitro* с детекцией CD25 на активированных лимфоцитах для оценки формирования иммунного ответа при вакцинации против чумы.

Данный подход для оценки специфической активности противочумной вакцины имеет ряд важных преимуществ:

- не требует проведения исследований с заражением вакцинированных животных высоковирулентным штаммом возбудителя чумы, что позволяет исключить опасность заражения и сократить длительность проведения эксперимента до 21 сут;
- анализ иммуногенной активности вакцины может быть выполнен в сжатые сроки (24 ч);
- дает возможность количественно оценить активность специфического клеточного иммунитета как ведущего звена иммунной защиты против чумы.

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.

5.2 Изучение возможности использования антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета у людей

В последние годы напряженность иммунитета и специфическая чувствительность к антигену все чаще оценивается *in vitro* с использованием технологии проточно-цитометрического анализа. Для получения надежных и воспроизводимых результатов важно правильно подобрать специфические антигены для реакции и их дозировку, так как некоторые из них способны неспецифически взаимодействовать с лимфоцитами *in vitro*.

Полученный из биомассы чумного микроба EV водорастворимый антигенный комплекс использовался в качестве специфического антигена при проведении исследований методом проточной цитометрии. В наших предварительных опытах определена возможность применения ВрАг в качестве активатора лимфоцитов в методе КАСТ.

Оценку у вакцинированного контингента уровня Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы (CD25) на 21 сутки после вакцинации, проводили методом проточной цитометрии после стимуляции в условиях *in vitro* специфическим антигеном чумного микроба с разными концентрациями белка (2,5; 4,5 и 9,0 мг/мл).

Исследования интенсивности экспрессии лимфоцитов до вакцинации показали, что активация Т-лимфоцитов при воздействии ВрАг не наблюдается. К 21 суткам при активации клеток комплексом водорастворимых антигенов чумного микроба с концентрацией белка 2,5 мг/мл отмечается незначительная активация лимфоцитов - до $16,31 \pm 0,52$ %, что говорит о недостаточном количестве специфического агента в ВрАг.

Спонтанной активации лимфоцитов при воздействии стерильного изотонического раствора (контроль) не зафиксировано.

При концентрации белка 4,5 мг/мл отмечается статистически достоверное повышение интенсивности экспрессии лимфоцитами рецептора CD25,

исследуемый показатель имел двукратное увеличение по сравнению со значением до вакцинации, составив в среднем $27,92 \pm 1,82$ % ($p \leq 0,05$).

При активации клеток ВpAg с концентрацией белка 9,0 мг/мл наблюдалась незначительная активация лимфоцитов – до $14,22 \pm 0,31$ %, что свидетельствовало о блокировке (экранировании) рецепторов большим количеством белка в комплексе водорастворимых антигенов. Результаты исследования представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Динамика экспрессии лимфоцитами рецепторов CD25 до и после вакцинации против чумы

Концентрация белка, мг/мл	До вакцинации		21 сут после вакцинации	
	Контроль (0,9 % р-р NaCl)	ВpAg	Контроль (0,9 % р-р NaCl)	ВpAg
2,5	$12,12 \pm 1,22$	$14,15 \pm 1,04$	$12,18 \pm 1,38$	$16,31 \pm 0,52$
4,5				$27,92 \pm 1,82$
9,0				$14,22 \pm 0,31$

Таким образом, комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба с концентрацией белка 4,5 мг/мл обладал наибольшим стимулирующим потенциалом *in vitro* в отношении иммунных лимфоцитов по маркеру CD25.

Учитывая вышеизложенное, целью дальнейших исследований было изучение возможности оценки поствакцинального противочумного иммунитета с использованием клеточного антиген-стимулированного теста *in vitro* и технологии цитометрического анализа.

Обследуемый контингент (люди) подлежал ежегодной иммунизации против чумы по эпидемическим показаниям. Взятие крови осуществляли в следующие сроки: до вакцинации, на 7 и 21 сут, через 3, 6, 9 и 12 мес (срок наблюдения) 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 с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител (Beckman Coulter, США).

Анализ проведенных исследований показал, что до вакцинации у обследуемых статистически значимой разницы в количестве CD25-позитивных лимфоцитов не выявлено. Так, при инкубации с 0,9 % раствором натрия хлорида количество CD25 лимфоцитов в среднем составило – $12,12 \pm 1,22$ %, при активации комплексом водорастворимых антигенов вакцинного штамма *Y. pestis* EV – $14,15 \pm 1,04$ %.

Во все периоды обследования спонтанной активации лимфоцитов не зафиксировано.

При активации клеток специфическим антигеном ВpAg уже на 7 сут отмечалось статистически достоверное повышение интенсивности экспрессии лимфоцитами рецептора к IL-2Ra (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 $27,92 \pm 1,82$ % ($p \leq 0,05$) (Таблица 14).

Таблица 14 – Количество специфически активированных Т-лимфоцитов (CD25, %), у лиц вакцинированных против чумы

Сроки исследования	Стимулирующий антиген (ВpAg)	Контроль (0,9 % р-р NaCl)
до вакцинации	$14,15 \pm 1,04$	$12,12 \pm 1,22$
7 сут после вакцинации	$19,39 \pm 2,19$	$13,18 \pm 1,47$
21 сут после вакцинации	$27,92 \pm 1,82$	$12,18 \pm 1,38$

Но уже в последующие сроки после введения вакцины наблюдалось снижение 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 ($p \leq 0,05$) (Рисунок 4).

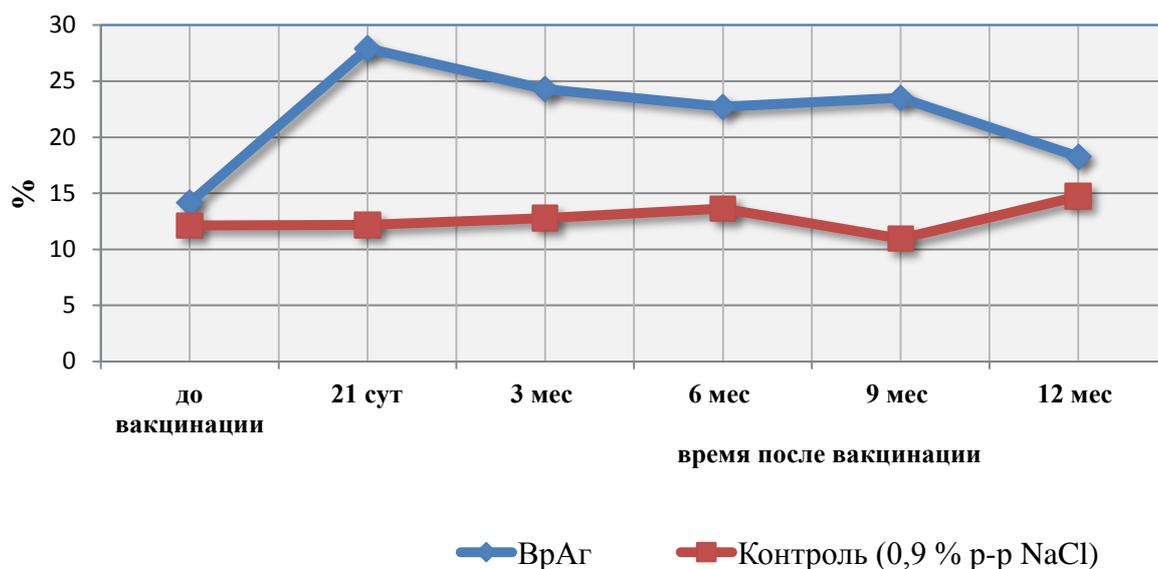


Рисунок 4 – Количество специфически активированных Т-лимфоцитов (CD25)

Полученные данные позволяют констатировать, что при стимуляции специфическим антигеном отмечается повышение экспрессии CD25 в 2,3 раза на 21 сут, в 1,9 раз – через 3 мес, в 1,7 раз – через 6 и 9 мес и в 1,2 – через 12 мес. При этом – на 21 сут у 11, через 3 мес – у 6 и через 6 мес – у 3 обследуемых содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD25 антиген, двукратно превышало контрольные значения.

По данным современной литературы, экспрессия лимфоцитами антигена DR главного комплекса гистосовместимости II класса ассоциирована с поздней и длительной активацией лимфоцитов. HLA-DR-позитивные лимфоциты длительно циркулируют в кровотоке, отражая активированное состояние иммунной системы.

Интенсивность экспрессии HLA-DR лимфоцитами у обследуемых до вакцинации при инкубации с изотоническим раствором NaCl составила $12,44 \pm 2,31$ %, специфическим антигеном *Y.pestis* – $13,02 \pm 2,48$ %, что не составляет достоверной разницы.

Во все сроки исследования спонтанного усиления экспрессии лимфоцитами антигена DR не установлено.

При активации лимфоцитов *in vitro* ВрАг на 7, 21 сут и через 3 мес после вакцинации не выявлено статистически значимой разницы в значениях интенсивности экспрессии маркера поздней активации в сравнении с контролем. На 7 сут количество HLA-DR позитивных лимфоцитов составило в среднем $16,99 \pm 0,91$ %, на 21 сут – $29,05 \pm 2,81$ %, через 3 мес – $27,81 \pm 2,56$ % (Таблица 15).

Таблица 15 – Количество специфически активированных Т-лимфоцитов (HLA-DR), %

Сроки обследования	Стимулирующий антиген (ВрАг)	Контроль (0,9 % р-р NaCl)
до вакцинации	$13,02 \pm 2,48$	$12,44 \pm 2,31$
ч/з 7 сут после вакцинации	$16,99 \pm 0,91$	$15,82 \pm 1,35$
ч/з 21 сут после вакцинации	$29,05 \pm 2,81$	$28,45 \pm 1,92$
ч/з 3 мес после вакцинации	$27,81 \pm 2,56$	$27,32 \pm 2,98$

Однако при обследовании вакцинированных через 6 мес после иммунизации установлено достоверное повышение интенсивности экспрессии антигена DR, составившее в среднем $23,45 \pm 2,71$ % (контроль – $16,50 \pm 1,63$ %) ($p \leq 0,05$), при этом у двух вакцинированных этот показатель был выше контрольных значений в 2 раза. Через 9 мес количество лимфоцитов сохранилось на прежнем уровне – $23,52 \pm 1,65$ % по сравнению с предыдущим сроком исследования (контроль – $18,62 \pm 1,67$ %), а к 12 мес показатель снизился до $13,85 \pm 0,88$ % (контроль – $13,86 \pm 0,77$ %) (Рисунок 5)

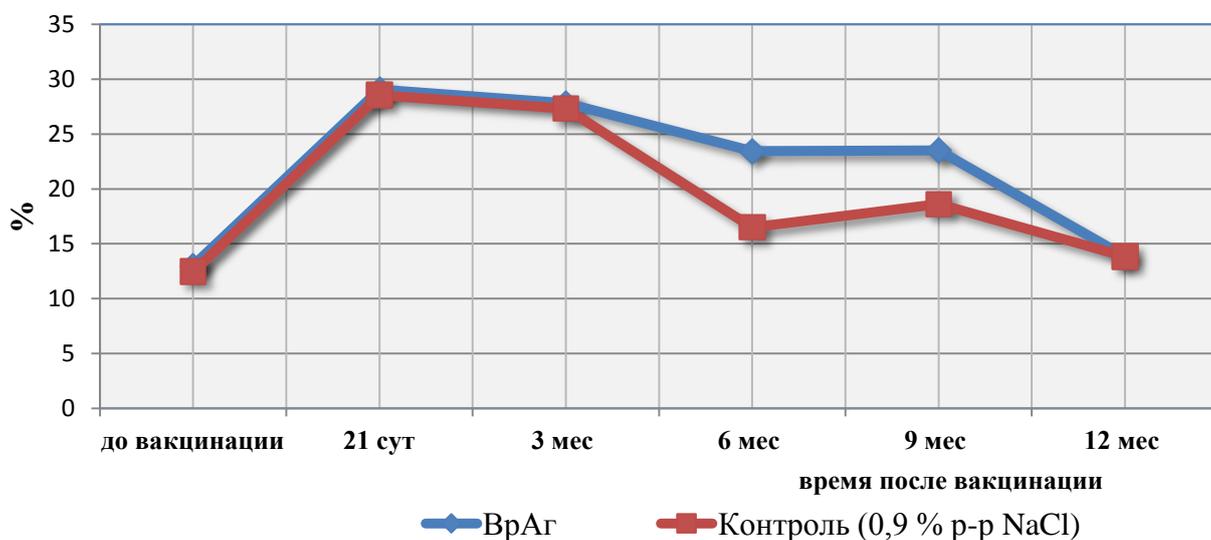


Рис. 5 – Количество специфически активированных Т-лимфоцитов (HLA-DR)

Таким образом, проведенные исследования показали, 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 – пик иммуногенеза. Через 3 мес наблюдается повышение количества клеток HLA-DR (поздняя активация) при одновременном снижении CD25, что свидетельствует о дальнейшем этапе формирования адаптивного иммунного ответа.

Для оценки иммунной перестройки организма после вакцинации Н.В. Богачевой и соавторами (2013) был предложен расчет коэффициента стимуляции (КС), который позволяет оценить иммунологическую эффективность проведения вакцинации против чумы.

Анализ стимулирующего потенциала комплекса водорастворимых антигенов *Y. pestis* EV относительно активации сенсibilизированных лимфоцитов в условиях *in vitro* показал, что коэффициент стимуляции относительного содержания лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD25, во все сроки наблюдения был положительный, при этом наибольшего значения он достигал на 21 сут (56,37 %) после иммунизации, что подтверждает известный факт формирования в этот срок наиболее выраженного иммунного ответа. При выявлении HLA-DR клеток отмечается резкое повышение КС через 6 и 9 мес, что отражает активированное состояние иммунной системы (Рисунок 6).

Важно отметить, что динамика интенсивности экспрессии маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов показала возможность и перспективу применения данного методического подхода для лабораторной оценки формирования поствакцинального иммунитета (фактической привитости) у вакцинированных на ранних (21 сут) и поздних (6-9 мес) сроках после иммунизации.

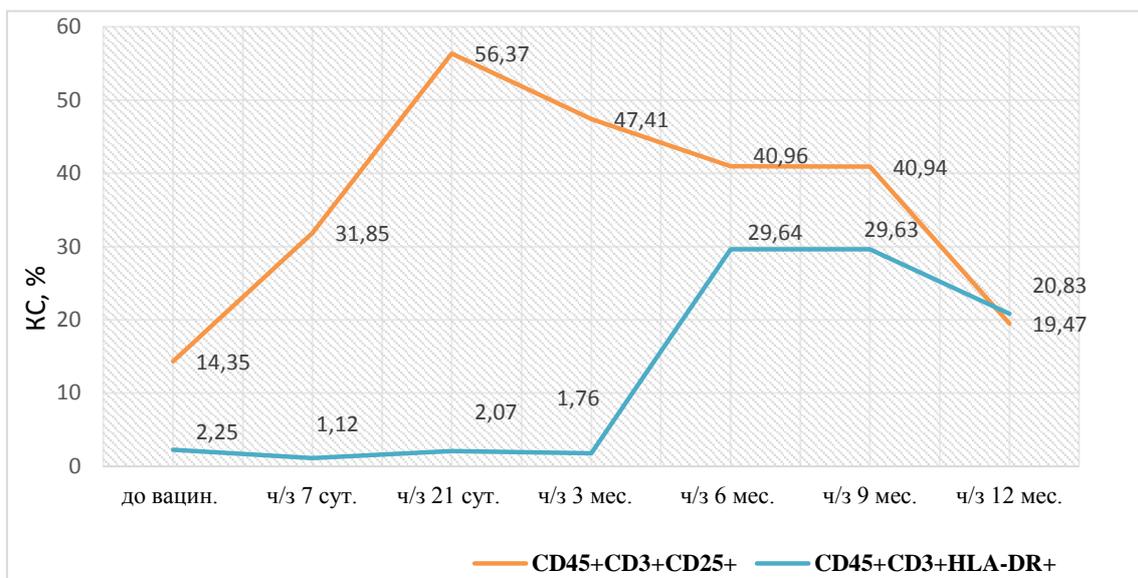


Рисунок 6 – Динамика значений КС лимфоцитов крови людей, вакцинированных против чумы, при *in vitro* активации ВрАг

Результаты экспериментов показали, что, с учетом ключевой роли клеточного иммунитета при чуме, использование клеточного антигенспецифического теста *in vitro* и технологии цитометрического анализа открывает возможность количественно определять поствакцинальную специфическую антигенреактивность лимфоцитов. Полученные результаты могут быть основанием для разработки нового метода количественной оценки иммунологической эффективности вакцинации против чумы, основанного на выявлении маркеров активации лимфоцитов при стимуляции специфическим антигеном.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В биотехнологии производства вакцины чумной живой важное значение имеют питательные среды, позволяющие получить достаточно большой объем биомассы вакцинного штамма *Y. pestis* EV.

На данный момент в промышленный регламент производства вакцины (ПР 01897080-09-16) для накопления биомассы вакцинного штамма включены агар Хоттингера и кукурузно-казеиновая питательная среда.

Актуальность работ в данном направлении обусловлена заинтересованностью как производителя, так и потребителя в снижении себестоимости и цены готового препарата с сохранением или даже улучшением регламентированных параметров качества.

Для конструирования питательной среды в качестве исходного сырья мы использовали кукурузный экстракт сгущенный (побочный продукт крахмально-паточного производства), который является одним из источников азотсодержащих компонентов питательных сред и, кроме того, богат микроэлементами, аминокислотами и витаминами.

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

В качестве стимуляторов роста чумного микроба в рецептуру питательной среды добавлена соль Мора ($\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и натрий сернистокислый (Na_2SO_3), а в качестве буферного соединения – натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). В ходе эксперимента тестировали другой вариант питательной среды без добавления стимуляторов.

В процессе конструирования питательных сред каждую серию контролировали в трехкратном повторе по физико-химическим и биологическим показателям.

Результаты проведенных исследований показали, что по физико-химическим (рН, сухого остатка, аминного азота, прозрачность геля, температура плавления, застудневания) и биологическим (показатель прорастания, стабильности, эффективности) свойствам питательная среда ГКЭС полноценна по компонентному составу, эффективна при культивировании вакцинного штамма *Y. pestis* EV, обеспечивает оптимальные условия для его выращивания и характеризуется простой технологией приготовления.

Вышеизложенное послужило основанием для дальнейших исследований экспериментальной среды в сравнении с регламентированными питательными средами для выращивания биомассы вакцинного штамма чумного микроба. В соответствии с промышленным регламентом производства вакцины чумной живой было получено 18 серий препарата (6 – с выращиванием на питательном агаре Хоттингера, 4 – на кукурузно-казеиновом агаре и 8 – на агаре ГКЭС) и проведено сравнительное изучение регламентированных показателей качества всех серий.

Проведенный анализ показал, что жизнеспособность серий вакцины, приготовленной на агаре ГКЭС, в 1,3 раз выше, чем у серий, полученных на регламентированных питательных средах ($p \leq 0,05$). Помимо этого, серии, полученные на среде ГКЭС, отличаются повышением показателя термостабильности в 1,9 раз, что говорит об оптимально подобранной питательной среде, которая способствует сохранению живых микробных клеток при хранении препарата.

Сконструированная питательная среда ГКЭС была апробирована как накопительная для выращивания вакцины чумной аппаратным методом на плотной питательной среде в производственных условиях.

В ходе эксперимента было проведено пять технологических циклов и получено 8 экспериментальных серий.

Качество питательной среды оценивали по выходу микробной массы. Питательная среда считается пригодной для производства биомассы чумного

микроба при показателе эффективности не менее 4 млрд. м.к. с 1 мл среды. Среднее количество бакмассы, полученной с 1 мл среды, составило $4,7 \pm 0,3$ млрд. м.к./мл, следовательно, данная плотная питательная среда на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного обеспечивает высокий уровень роста биомассы вакцинного штамма.

Проанализированные данные позволяют сделать вывод о том, что вакцина чумная живая, приготовленная на питательной среде из ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, по всем исследованным свойствам (культурально-морфологические, специфическая активность, потеря в массе при высушивании, термостабильность, специфическая безопасность, иммуногенность) соответствует требованиям нормативной документации.

По результатам проведенной работы разработанная питательная среда на основе ферментативного гидролизата кукурузного экстракта сгущенного с ростостимулирующими добавками внесена в действующий регламент производства чумной вакцины. Использование данной питательной среды при промышленном выпуске позволит повысить качество и снизить себестоимость конечной продукции.

Биотехнология производства препарата вакцины чумной живой построена на последовательном выполнении регламентированных этапов производственного цикла. Оптимизация отдельных этапов приготовления препарата при неизменности самих биотехнологических стадий способствуют улучшению конечных показателей.

В соответствии с промышленным регламентом производства смыв микробной массы с АКМ-Ш проводят двукратно, средой высушивания. Полученные суспензии отличаются по показателям концентрации и по соотношению: количество микробных клеток/компоненты стабилизатора, количество микробных клеток/продукты метаболизма.

Для стандартизации качества полученной биомассы и произведенной из нее вакцины очевидна целесообразность унификации условий синхронизации, то есть объединение двух микробных взвесей в одну непосредственно после

смыва, что может способствовать получению более жизнеспособного препарата вакцины чумной живой.

С целью подтверждения этого предположения, «методом объединенного смыва» в течение трех технологических циклов изготовили пять экспериментальных серий, которые были исследованы по основным регламентированным показателям качества препарата. Для сравнения четыре контрольные серии были получены традиционным методом и исследованы по тем же параметрам.

Все микробные взвеси выдерживали при температуре (4 ± 2) °С в течение 48 ч. Было отмечено, что биологическая концентрация полученных микробных суспензий (процент живых м.к.) уменьшается за время синхронизации, при этом наибольшее снижение наблюдалось в микробных взвесах с максимальной густотой смыва.

Следует отметить, что все серии соответствовали основным регламентированным нормам. Отмечено, что показатель жизнеспособности в экспериментальных сериях вакцины, полученных «методом объединенного смыва», непосредственно после лиофилизации был выше ($45,9\pm 3,6$ %) по сравнению с аналогичным показателем контрольных серий ($34,6\pm 4,3$ %) ($p\leq 0,05$).

Показатель иммуногенности определялся для экспериментальных серий № 3; 5 и для контрольной серии № 4, он соответствовал необходимым значениям (не превышал 1×10^4 ж.м.к. для морских свинок и 4×10^4 ж.м.к. для белых мышей), что говорит об иммунологической эффективности препарата.

Таким образом, проведенные исследования показали, что предложенный «метод объединенного смыва» позволяет улучшить качество конечного продукта по показателю жизнеспособности. Полученные данные стали основанием для внедрения модифицированного этапа смыва в ПР производства.

Срок годности лекарственного препарата вакцины чумной живой составляет три года при хранении и транспортировании в условиях «холодовой цепи».

Основополагающий показатель для живой вакцины – это количество жизнеспособных клеток в лиофилизате, которые определяют число доз в ампуле. Для изучения стабильности препарата, полученного «методом объединенного смыва», был проведен мониторинг жизнеспособности экспериментальных и коммерческих (контрольных) серий через различные промежутки времени его хранения (через 1, 2 и 3 года).

Проведенные исследования показали, что в течение первых трех месяцев происходило закономерное незначительное снижение количества живых м.к. в препарате, жизнеспособность экспериментальных серий снизилась в среднем на 2,2 %, а контрольных – на 2,7 %, но эти различия статистически не значимы ($p \leq 0,05$).

Через один год хранения вакцины, полученной методом объединенного смыва, процент жизнеспособности снизился в среднем на 2,6 %, а к окончанию срока годности препарата – еще на 2,4 %, но ни в одном случае не произошло уменьшения жизнеспособности ниже регламентированного уровня в 25 %. Анализ результатов показал, что всего за три года хранения жизнеспособность вакцины упала на 5,0 % (по сравнению с исходной), тогда как в контроле этот показатель снизился до 6,3 % (различия статистически не значимы $p \leq 0,05$).

В результате проведенной работы по оптимизации биотехнологического этапа показано, что препарат вакцины чумной живой, полученный «методом объединенного смыва», сохраняет стабильность регламентированных показателей в течение всего срока годности и имеет хорошие показатели жизнеспособности при длительных сроках хранения.

Иммунологическая активность – одна из основных характеристик вакцины, отражающая ее профилактическую эффективность. Контроль качества производственных серий вакцины против чумы проводится в соответствии с нормативной документацией на препарат (ПР, ФСП) и предполагает проведение иммунизации и последующее заражение лабораторных животных.

Главный недостаток регламентированного метода оценки иммуногенности вакцины чумной живой – это необходимость длительного (21 день) содержания

зараженных вирулентным возбудителем чумы животных и связанная с этим потенциальная опасность работ с вирулентным штаммом чумного микроба.

Учитывая ведущую роль клеточного иммунитета в образовании и реализации противочумного иммунитета, изучена возможность оценки иммунного ответа с использованием метода КАСТ, основанного на выявлении маркеров активации лимфоцитов при стимуляции специфическим антигеном (комплекс водорастворимых антигенов *Y. pestis* EV). Анализируя маркеры ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации лимфоцитов, определяли интенсивность антигенреактивности лимфоцитов в клеточных тестах *in vitro*.

В качестве биомодели использовали аутбредных белых мышей: 4 группы по 30 особей, иммунизированных подкожно регламентированными дозами чумной вакцины (8×10^2 , 4×10^3 , 2×10^4 и 1×10^5 (живых м.к.). Взятие крови (из сердца в объеме 1,0-1,5 мл) осуществляли до вакцинации, на 7, 14 и 21 сут после иммунизации (у 6 животных из каждой группы).

В ходе эксперимента интенсивность антигенреактивности Т-лимфоцитов определяли в клеточных тестах *in vitro*, анализируя количество CD25 лимфоцитов с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител. Постановка реакции осуществлялась в течение 24 ч после взятия материала.

В контрольной пробе с целью выявления возможной спонтанной активации лимфоцитов клетки инкубировали со стерильным 0,9 % изотоническим раствором натрия хлорида.

В результате проведенных исследований установлено, что у интактных белых мышей количество лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации при воздействии комплексом водорастворимых антигенов *Y. pestis* EV (ВрАг), составило $4,33 \pm 0,51$ %, при воздействии 0,9 % раствором натрия хлорида – $3,82 \pm 0,38$ %. Следует отметить, что во все периоды обследования спонтанной активации лимфоцитов не зафиксировано.

При иммунизации самой высокой дозой – 1×10^5 живых м.к. – увеличение лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD25 в условиях стимуляции ВрАг,

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 $4,33 \pm 0,51$ ($p \leq 0,05$).

Согласно полученным данным у животных, вакцинированных дозами 4×10^3 , 2×10^4 и 1×10^5 живых м.к., наивысший уровень экспрессии лимфоцитами маркера активации при антигенной стимуляции *in vitro* регистрировался на 14 сут после иммунизации.

Для определения возможности применения данной методики в качестве контроля протективного действия вакцины против чумы, проводили сравнительное изучение уровня интенсивности экспрессии маркера ранней активации и наличия поствакцинального иммунитета, определяемого по показателю ED₅₀.

На 21 сут после иммунизации (срок формирования поствакцинального иммунитета против чумы) для подтверждения напряженности иммунитета, животных каждой группы заражали подкожно 200 DcI вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Через 21 сут после заражения рассчитывали ED₅₀ по формуле.

На основе полученных данных проводили сравнение количества выживших в опыте животных с повышением уровня лимфоцитов, экспрессирующих антигенспецифические рецепторы CD25, рассчитывая коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Установлена высокая степень прямой связи (коэффициент корреляции $r = 1,000$) количества выживших животных с увеличением уровня лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации. Полученные данные по количеству выживших животных в каждой группе вакцинированных коррелируют с изменением количества CD25 позитивных лимфоцитов.

Было выявлено, что при воздействии комплекса антигенов чумного микроба *in vitro* на лимфоциты иммунизированных против чумы биомоделей, наблюдается статистически значимое ($p \leq 0,05$) усиление экспрессии маркера ранней активации – CD25. Экспериментально установлено, что интенсивность антигенреактивности лимфоцитов четко коррелирует с иммунизирующей

дозой. При увеличении концентрации живых м.к. *Y. pestis* EV во вводимой вакцине в крови у животных отмечается пропорциональное повышение количества CD25-позитивных лимфоцитов после стимуляции ВpAg в условиях *in vitro*.

В целом, продемонстрирована возможность и перспектива применения клеточного антиген-специфического теста *in vitro* с детекцией CD25 на активированных лимфоцитах для оценки формирования иммунного ответа при вакцинации против чумы.

Предложенный подход для оценки специфической активности противочумной вакцины имеет ряд важных преимуществ:

- не требует проведения исследований с заражением вакцинированных животных высоковирулентным штаммом возбудителя чумы, что позволяет повысить безопасность работы и сократить длительность проведения эксперимента до 21 сут;

- анализ иммуногенной активности вакцины может быть выполнен в сжатые сроки (24 ч);

- дает возможность количественно оценить активность специфического клеточного иммунитета, как ведущего звена иммунной защиты против чумы.

В перспективе данный подход можно использовать в качестве дополнительного контрольного теста при изучении степени иммуногенности новых (кандидатных) вакцин против чумы в сравнении с зарегистрированными препаратами.

В предварительных опытах определена возможность применения комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба в качестве активатора лимфоцитов в антигенспецифических клеточных тестах *in vitro*.

Спонтанной активации лимфоцитов при воздействии стерильного изотонического раствора NaCl (контроль) не зафиксировано.

В дальнейших исследованиях использовался комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба с концентрацией белка 4,5 мг/мл, так как именно в

этом количестве он обладает наибольшим стимулирующим потенциалом *in vitro* в отношении иммунных лимфоцитов.

Учитывая вышеизложенное, далее оценивали возможность использования метода КАСТ для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета у людей.

Обследуемый контингент (люди) подлежал ежегодной иммунизации против чумы по эпидемическим показаниям. Взятие крови осуществляли: до вакцинации, на 7 и 21 сутки, через 3, 6, 9 и 12 месяцев (срок наблюдения) 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.

Во все периоды обследования спонтанной активации лимфоцитов не зафиксировано.

При активации клеток специфическим антигеном ВрАг уже на 7 сут отмечалось статистически достоверное повышение интенсивности экспрессии лимфоцитами рецептора к IL-2Ra (CD25) до $19,39 \pm 2,19$ %. А к 21 сут исследуемый показатель имел двукратное увеличение по сравнению с значением до вакцинации, составив в среднем $27,92 \pm 1,82$ % ($p \leq 0,05$).

Но уже в последующие сроки после введения вакцины наблюдалась тенденция к снижению количества CD25-позитивных лимфоцитов в 2,3 раза на 21 сут, в 1,9 раз – через 3 мес, в 1,7 раз – через 6 и 9 мес и в 1,2 – через 12 мес.

По данным современной литературы, HLA-DR-позитивные лимфоциты длительно циркулируют в кровотоке, отражая активированное состояние иммунной системы.

Интенсивность экспрессии HLA-DR (маркер поздней активации) лимфоцитами у обследуемых до вакцинации при инкубации с изотоническим раствором составила $12,44 \pm 2,31$ %, специфическим антигеном *Y.pestis* – $13,02 \pm 2,48$ %, что не составляет достоверной разницы.

При активации лимфоцитов *in vitro* ВpAg на 7, 21 сут и через 3 мес после вакцинации, не выявлено разницы в значениях интенсивности экспрессии маркера поздней активации в сравнении с контролем.

Однако при обследовании вакцинированных через 6 мес после иммунизации установлено достоверное повышение интенсивности экспрессии антигена DR, составившее в среднем $23,45 \pm 2,71$ % (контроль – $16,50 \pm 1,63$ %) ($p \leq 0,05$). Через 9 мес количество лимфоцитов сохранилось на прежнем уровне – $23,52 \pm 1,65$ % (контроль – $18,62 \pm 1,67$ %) по сравнению с предыдущим сроком исследования, а к 12 мес показатель снизился до $13,85 \pm 0,88$ % (контроль – $13,82 \pm 0,77$ %).

Таким образом, в ходе проведенной работы было определено, 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 – пик иммуногенеза. Через 3 месяца наблюдается повышение количества клеток HLA-DR (поздняя активация) при одновременном снижении CD25, что свидетельствует о дальнейшем формировании адаптивного иммунного ответа.

По данным, полученным в ходе исследований для оценки иммунной перестройки организма после вакцинации, был рассчитан коэффициент стимуляции (КС), позволяющий оценить иммунологическую эффективность проведения вакцинации против чумы.

Анализ стимулирующего потенциала комплекса водорастворимых антигенов *Y. pestis* относительно активации сенсibilизированных лимфоцитов в условиях *in vitro* показал, что коэффициент стимуляции относительного содержания лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD25, во все сроки наблюдения был положительный, при этом наибольшее значение он достигал на 21 сут после иммунизации ($56,37$ %), что доказывает факт формирования в этот срок наиболее выраженного иммунного ответа. При выявлении HLA-DR клеток отмечается резкое повышение КС через 6 и 9 мес, что отражает активированное состояние иммунной системы.

Результаты исследований показали, что, с учетом ключевой роли клеточного иммунитета при чуме, использование метода КАСТ и технологии цитометрического анализа открывает возможность количественно определять поствакцинальную специфическую антигенреактивность лимфоцитов. Полученные результаты могут быть основанием для разработки нового (дополнительного) 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Dcl	– безусловно смертельная доза микробов
ED ₅₀	– иммунизирующая доза, защищающая 50 % зараженных животных
LD ₅₀	– заражающая доза, обеспечивающая гибель 50 % зараженных животных
АКМ-Ш	– аппарат для культивирования микроорганизмов Шестеренко для производственных условий
ГКЭС	– гидролизат кукурузного экстракта сгущенного
ГФ	– государственная Фармакопея
ж.м.к. КАСТ	– живые микробные клетки – клеточный антигенспецифический тест
мес	– месяц
м.к.	– микробные клетки
НД	– нормативная документация
ОСО	– отраслевой стандартный образец
ПР	– промышленный регламент
сут	– сутки
ТУ	– технические условия
ФСП	– фармакопейная статья предприятия
ч	– час

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абзаева, Н.В. Повышение жизнеспособности *Yersinia pestis* EV в биомассе вакцины: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Абзаева Наталья Вячеславовна – Ставрополь, 2010. – 18 с.
2. Анисимова, Т.И. Оценка качества и перспективы стандартизации чумных вакцин / Т.И. Анисимова // Проблемы особо опасных инфекций. – 1979. – Т. 66, № 2. – С. 25-27.
3. Апарин Г.П., Вершинина Т.И. Методические рекомендации по определению степени иммуногенности авирулентных штаммов чумного микроба для белых мышей / Г.П. Апарин. – Иркутск, 1984. – 8 с.
4. Афанасьев, Е.Н. Антигенная структура бруцелл. Сообщ. I. Сравнительная оценка методов выделения водорастворимых антигенов бруцелл / Е.Н. Афанасьев, И.Ф. Таран, И.С. Тюменцева. - Ставрополь, 1986. – 16 с. – Деп. в ВИНТИ, № 6635-B86.
5. Балахонов, С.В. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщ. 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты / С.В. Балахонов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 1. – С. 55-60.
6. Эффективность компонентов пестина ПП при определении корреляции аллергической реактивности и приобретённой резистентности к чуме / Р.А. Белобородов, Т.М. Тараненко, Е.Э. Бахрах, Н.К. Муравьева, В.К. Дудкова, А.Ф. Филиппов // Проблемы особо опасных инфекций. – 1974. – № 6 – С. 51-54.
7. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлюорометрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы / Н.В. Богачева, А.В. Крючков, И.В. Дармов, К.А. Воробьев, Д.В. Печенкин, Г.Д. Елагин, Д.П. Колесников // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 11 – С. 48-53.

8. Боровикова, Т.П. Вопросы оптимизации питательных сред в производстве чумной живой и холерной вакцин / Т.П. Боровикова, А.Ф. Филиппов, Н.Г. Тихонов // Проблемы специфической профилактики чумы и холеры. – 1985. - С. 80-88.
9. Исторические и современные представления о проблеме специфической профилактики чумы / С.А. Бугоркова, З.Л. Девдариани, Т.Н. Щуковская, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 3. – С. 63-69.
10. Научно-методическое обеспечение мероприятий по проведению иммунологического мониторинга вакцинированных против чумы лиц, проживающих на территориях природных очагов инфекции / С.А. Бугоркова, Т.Н. Щуковская, Н.И. Микшис, С.А. Щербакова, О.М. Кудрявцева, Е.В. Куклев, В.И. Дубровина, А.К. Носков, К.М. Корытов, С.В. Балахонов, Д.Н. Санджиев, С.В. Конушева, С.П. Савченко, Г.Б. Мацакова, Л.В. Щучинов, Е.П. Михайлов, Б.Л. Агапов, К.Б. Яшкулов, Т.Б. Каляева, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 2. – С. 6-13.
11. Иммунологический мониторинг вакцинированных против чумы в Прикаспийском песчаном природном очаге для оценки и управления рисками здоровью населения / С.А. Бугоркова, С.Н. Клюева, О.М. Кудрявцева, В.П. Топорков, Т.Н. Щуковская, А.Л. Кравцов, Н.И. Микшис, М.А. Тарасов, С.А. Щербакова, В.В. Кутырев // Анализ риска здоровью. – 2020. – № 4. – С. 121-129.
12. Качественные показатели микробных клеток штаммов *Yersinia pestis EV* в зависимости от их морфологических особенностей при разных температурных условиях в биологии приготовления препарата вакцины чумной / Д.А. Будыка, А.И. Бондаренко, А.А. Фисун, Н.В. Абзаева, Г.Ф. Иванова, С.Е. Гостищева, С.М. Руднев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – Т. 114, № 4 – С. 33-35.
13. Анализ воздействия экстремальной температуры на полуфабрикат вакцины чумной живой в различные сроки хранения готового препарата / Д.А. Будыка,

- А.А. Фисун, Н.В. Абзаева, Г.Ф. Иванова, Л.С. Катунина // Здоровье населения и среда обитания. – 2013. – Т. 38, № 5. – С. 28-30.
14. Биотехнология стабилизации живых микроорганизмов в биомассе и в препарате чумной вакцины / Д.А. Будыка, Н.В. Абзаева, С.Е. Гостищева, Е.Л. Ракитина, Г.Ф. Иванова, А.А. Фисун // Инфекция и иммунитет. – 2016. Т. 6, № 1. – С. 87-92.
 15. Зависимость между уровнем сероперестройки вакцинированных животных и напряженностью иммунитета к экспериментальной чуме / А.А. Бывалов, М.Ю. Дубровин, Г.Д. Елагин, Д.В. Печенкин, В.П. Бондарев // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 7 – С. 48-51.
 16. Бывалов, А.А. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы / А.А. Бывалов, В.В. Кутырев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – Т. 97, № 2. – С. 97-104.
 17. Бывалов, А.А., Оводов Ю.С. Иммунобиологические свойства антигенов *Yersinia pestis* / А.А. Бывалов, Ю.С. Оводов // Биоорганическая химия. – 2011. – Т. 37, № 4. – С. 452-463.
 18. Вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная (ВЧММ). Бактериология. – 2018 – Т. 3, № 1. – С. 74-76.
 19. Аллергенные свойства липополисахарида «основного» соматического и капсульного антигенов чумных микробов / В.И. Вейнблат, Р.А. Белобородов, С.А. Узенцов, Т.М. Тараненко, Е.Э. Бахрах // Проблемы особо опасных инфекций. – 1977. – Т. 56, № 4 – С. 20-22.
 20. Веркина, Л.М. Новый метод оценки противочумного иммунитета у людей / Л.М. Веркина, Г.И. Васильева // Клиническая лабораторная диагностика. – Москва: Медицина. – 1996. – № 3 – С. 30-32.
 21. Актуальные вопросы совершенствования специфической профилактики чумы и сибирской язвы / С.А. Витязева, С.В. Балахонов, В.И. Дубровина, Е.Ю. Марков, В.С. Половинкина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – № 4. – С. 63-66.

22. Гинсбург, Н.Н. Живые вакцины / Н.Н. Гинсбург. – М.: Медицина, 1969. – 336 с.
23. Экспериментальная оценка эффективности применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами / А.Ю. Гончарова, С.А. Бугоркова, О.М. Кудрявцева, В.А. Кожевников, А.Л. Кравцов, Т.Н. Каштанова, Т.Н. Щуковская // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 2. – С. 71-77.
24. Гюлушанян, К.С. Использование питательной среды на основе кукурузного экстракта в производстве чумной вакцины EV: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / Гюлушанян Карина Степановна. – Саратов, 1994. – 24 с.
25. Давыдов, Д.С. Анализ стабильности показателей качества биологических лекарственных препаратов при проведении испытаний в рамках подтверждения соответствия / Д.С. Давыдов // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – Т.4, № 17. – С. 230-232.
26. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 2. Иммунизирующая и ревакцинирующая активность препаратов для специфической профилактики чумы в экспериментах на морских свинках / С.М. Дальвадянец, И.А. Дятлов, С.А. Еремин, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2003. – № 86. – С. 123-132.
27. Девдариани, З.Л. Изучение иммуноаллергической перестройки организма привитых против чумы лабораторных животных с помощью теста ППН / З.Л. Девдариани, А.Ф. Филиппов, Т.М. Тараненко // Профилактика природноочаговых инфекций. – Ставрополь, 1983. – С. 190-191.
28. Девдариани, З.Л. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-АТ-Ф1 *YERSINIA PESTIS*) / З.Л. Девдариани, Н.Е. Терешкина, Т.М. Тараненко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 1 – С. 74-78.
29. Молекулярные основы вакцинопрофилактики чумы / С.В. Дентовская, П.Х. Копылов, С.А. Иванов, С.А. Агеев, А.П. Анисимов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2013. – № 3. – С. 3-12.

30. Разработка реагента для оценки начальной стадии иммунного ответа на живую чумную вакцину / П.Н. Дерябин, Б.В. Каральник, Т.Г. Денисова, Т.С. Пономарева, Б.Б. Атшабар, Г. Б. Жунусова, Т. И. Тугамбаев, А. А. Туружанова, С. Б. Закарян, З. Т. Алымкулова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 102-106.
31. Динамика антигенспецифических и регуляторных популяций лимфоцитов у людей, иммунизированных живой чумной вакциной / П.Н. Дерябин, П.Н. Пономарева, Т.С. Каральник, Е.А. Кустова, Н.Т. Уразалиева, Т.И. Тугамбаев, Т.Г. Денисова, З.Т. Алымкулова // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2016. – № 4. – С. 45-49.
32. Домарадский, И. В. Чума: современное состояние, гипотезы, проблемы / И.В. Домарадский. – Саратов, 1993. – 132 с.
33. Питательные среды для диагностики чумы / Л.В. Домотенко, Я.В. Подкопаев, М.В. Храмов, И.А. Дятлов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – № 4. – С. 60-65.
34. Стратегия оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии / И.А. Дятлов, В.В. Фирстова, Н.Л. Бондаренко, А.В. Караулов // Аллергология и иммунология. – 2016. – Т. 17, № 2. – С. 112–14.
35. Емельянова, Н.В. Влияние антигенов и штаммов чумного микроба с экспрессией различных детерминант иммуногенности и вирулентности на уровень бласттрансформации лимфоцитов и активность интерлейкинов (1 и 2) при формировании иммунитета к чуме: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 14.00.36 / Емельянова Наталья Вячеславовна. – Саратов, 1993. – 175 с.
36. Ефременко, А.А. Разработка биотехнологии вакцины чумной живой сухой со сниженным количеством человекодоз в производственной упаковке (ампуле): дис. ... канд. мед. наук : 03.00.23 / Ефременко Анна Александровна. – Ставрополь, 2005. – 117 с.
37. Зверев, В.В. Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. – Москва: ГЭОТАР-Медиа. – 2011. – 847 с.

38. Анализ стабильности производства вакцины чумной живой и основных показателей качества препарата / А.А. Зуенко, Н.В. Абзаева, С.Е. Гостищева, О.Л. Старцева, Т.М. Гридина, Ю.В. Богданова, Г.Ф. Иванова, Д.В. Ростовцева // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 4. – С. 54-57.
39. Иванова, Г.Ф. Усовершенствование посевного материала и условий засева культуры в процессе производства чумной вакцины: дис. ...канд. мед. наук / Иванова Галина Филипповна. – Ставрополь. – 1991. – 161с.
40. Капсульный антиген чумного микроба / Л.А. Кадникова, П.Х. Копылов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Инфекция и иммунитет. – 2015. – Т.5, № 3. – С. 201-218.
41. Календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. – Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21.03.2014 № 125н. – Москва, 2014.
42. Выявление иммунной памяти на первом этапе антигенспецифического клеточного ответа при повторном введении живой чумной вакцины / Б.В. Каральник, П.Н. Дерябин, Т.Г. Денисова, Т.С. Пономарева, Г.Б. Жунусова, С.Б. Закарян, Р.Б. Мухамедьярова // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2019. – Т. 18, № 6. – С. 26-33.
43. Аттестация новой серии отраслевого стандартного образца для контроля специфической активности и термостабильности вакцины чумной живой / И.В. Касина, С.А. Алексеева, О.В. Фадейкина, Т.И. Немировская, Р.А. Волкова // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Т. 18, № 4. – С.262-267.
44. Катунина, Л.С. Питательная среда для выращивания чумного микроба и сбора биомассы вакцинного штамма *Y. pestis EV* / Л.С. Катунина, А.А. Курилова, Ю.С. Ковтун // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных [Электронный ресурс]: материалы II Всероссийской научно-практической конференции / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь. – 2017. – С. 315-316.

45. Кетлинский С.А. Роль Т-хелперов типов 1 и 2 в регуляции клеточного и гуморального иммунитета / С.А. Кетлинский // Иммунология. – 2002. – № 2. – С. 77-79.
46. Ключева, С.Н. Влияние олигодезоксинуклеотида CpG ODN 2006 на продукцию цитокинов клетками крови людей, вакцинированных против чумы / С.Н. Ключева, Т.П. Шмелькова, Т.Н. Щуковская // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 6. – С. 531-538.
47. Ключева, С.Н. Влияние адъювантов нового поколения *in vitro* на продукцию цитокинов клетками крови вакцинированных против чумы лиц / С.Н. Ключева, Т.Н. Щуковская // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9(18), № 2. – С. 201-208.
48. Оценка уровня гуморального и клеточного иммунитета после ревакцинации против чумы лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага / С.Н. Ключева, С.А. Бугоркова, Т.Н. Щуковская, Д.Н. Санджиев, С.В. Конушева, С.П. Савченко, Б.А. Хасыкова, С.А. Щербакова // Медицинская иммунология. – 2018. – № 2. – С. 241-250.
49. Коновалова, Ж.А. Некоторые пути оптимизации процесса производства вакцины чумной живой и способы оценки ее иммуногенности (обзор) / Ж.А. Коновалова, А.Г. Атлас, В.И. Дубровина // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 2(90), Ч. 2. – С. 191-196.
50. Коробкова, Е.И. Живая противочумная вакцина / Е.И. Коробкова. – М.: Медгиз, 1956. – 205 с.
51. Оценка иммунологической эффективности вакцинации против чумы в активном природном очаге. Сообщение 1. Цитокиновый и иммуноглобулиновый статус / К.М. Корытов, В.В. Войтикова, В.И. Дубровина, А.К. Носков, А.И. Мищенко, С.В. Балахонов // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2017. – № 2(93) – С. 45-49.
52. Кравцов, А.Л. Влияние противочумной вакцинации на функциональную активность клеток врожденного иммунитета человека / А.Л. Кравцов, Т.П.

- Шмелькова, Т.Н. Щуковская // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 107. – С. 77-80.
53. Модулирующий эффект полиоксидония на реактивность клеток иммунной системы при формировании противочумного иммунитета / А.Л. Кравцов, А.Ф. Курылина, С.Н. Ключева, Т.Н. Щуковская // Иммунология. – 2016. – № 6. – С. 320-325.
54. Характеристика показателей клеточного иммунитета у вакцинированных против чумы лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы / А.Л. Кравцов, В.А. Кожевников, С.Н. Ключева, О.М. Кудрявцева, Т.Н. Щуковская, Н.И. Микшис, С.А. Бугоркова // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2019. Т. 18, № 4. – С. 67-74.
55. Выявление ассоциаций генов HLA II класса главного комплекса гистосовместимости с особенностями иммунного ответа у лиц, вакцинированных живой чумной вакциной в Республике Калмыкия / О.М. Кудрявцева, Т.Н. Щуковская, Н.И. Микшис, С.Н. Ключева, С.А. Бугоркова, Д.Н. Санджиев, С.В. Конушева, С.П. Савченко, Б.А. Хасыкова, С.А. Щербакова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 3. – С. 95-99.
56. Ассоциация показателей функциональной активности маркеров Th1 и Th2 иммунитета с полиморфизмом генов HLA у лиц, вакцинированных против чумы / О.М. Кудрявцева, С.А. Бугоркова, Т.Н. Щуковская, Н.И. Микшис, А.Ю. Гончарова, С.Н. Ключева, С.А. Щербакова // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9, № 2. – С. 315-324.
57. Куклева, Л.М. Адгезины возбудителя чумы / Л.М. Куклева // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 2. – С. 14-22.
58. Разработка питательных сред из растительного сырья для культивирования возбудителей особо опасных инфекций / А.А. Курилова, Т.В.Таран, Л.С. Катунина, С.И. Головнева // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – № 101. – С. 66-68.
59. Курилова, А.А. Разработка технологии приготовления ферментативного гидролизата глютена кукурузного с целью получения стандартной питательной

- основы / А.А. Курилова, Ю.С. Ковтун, Л.С. Катунина // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных [Электронный ресурс]: материалы II Всероссийской научно-практической конференции / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь. – 2017. – С. 246-248.
60. Кутырев, В.В. Противочумная система Российской Федерации в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия / В.В. Кутырев, // Здравоохранение Российской Федерации. – 2013. – № 2. – С. 24-28.
61. Обеспечение эпидемиологического благополучия по чуме в условиях обострения эпизоотической обстановки в Прикаспийском песчаном природном очаге в 2014 г. / В.В. Кутырев, А.Ю. Попова А.Ю., Е.Б. Ежлова, Ю.В. Демина, Н.Д. Пакскина, В.Е. Безсмертный, В.П. Топорков, Н.В. Попов, В.В. Кабин, К.Б. Яшкулов, Д.М. Бамматов, А.И. Ковтунов, Д.Н. Санджиев, Е.С. Зенкевич, А.К. Гражданов, А.Н. Матросов, А.А. Кузнецов, И.Н. Шарова, А.А. Лопатин, М.П. Григорьев, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 4. – С. 22-29.
62. Использование жидкой питательной среды из ферментативного гидролизата белков обезжиренного коровьего молока в технологии вакцины чумной живой сухой / А.А. Лещенко, В.В. Тетерин, А.Г. Лазыкин, А.В. Ежов, А.З. Хонин, Д.А. Мохов, В.В. Бирюков, С.В. Багин, С.В. Логвинов // БИОпрепараты. – 2011. – Т. 3, № 43. – С. 53-56.
63. Экспериментальное обоснование возможности получения концентрата микробных клеток штамма *Yersinia pestis* EV методом микрофльтрации / А.А. Лещенко, В.В. Тетерин, А.Г. Лазыкин, А.В. Ежов, Д.А. Мохов, В.В. Бирюков // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2014. – № 1(49). – С. 31-35.
64. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Л.С. Литвинова, А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич, К.А. Кофанова, О.Г. Хазиахматова, В.В. Шуплецова, Е.В. Кайгородова, А.Г. Гончаров // Медицинская иммунология. – 2014. – № 1. – С. 7-26.

65. Лопатина, Н.В. Экспериментальная адаптация вакцинного штамма чумного микроба к процессу лиофилизации / Н.В. Лопатина, Б.Н. Мишанькин // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2018. – № 3. – С. 51-56.
66. Рекомбинантные полипептиды как биомаркеры оценки иммунологической эффективности вакцинации живой чумной вакциной у людей / А.М. Ляпина, В.А. Федорова, М.А. Хижнякова, М.В. Телепнев, В.Л. Мотин // Медицинский академический журнал. – 2012. – № 3. – С. 85-87.
67. Лясоцкий, Л.Л. Внутрикожная реакция на пестин как показатель иммунитета к чуме /Л.Л. Лясоцкий // Доклады Иркутского противочумного института. – Иркутск, 1971. – № 9. – С. 70.
68. Полярнографический метод в оценке культуральных свойств вакцинного штамма ЕВ / Н.В. Мартынов, Е.В. Чеботарев, В.А. Лебединский, Ю.В. Чичерин, Н.П. Додонов, А.А. Нестеренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1990. – № 12. – С. 18–21.
69. А.с. № 2532790/28-10.06.10.77 С 12 К 1/06. Способ получения питательной основы из кукурузного экстракта / В.Г. Майский, А.З. Куцемакина. - № 662583; заявл. 06.10.77; опубл. 15.05.79, Бюл. № 12. – 2 с.
70. Медуницин, Н.В. Вакцинология / Н.В. Медуницин, – Москва, 2010. – 507 с.
71. Методические рекомендации по использованию НАДФ Н-оксидазной активности макрофагов в качестве показателя иммунологической перестройки организма. – Иркутск, 1981. – 5 с.
72. Микшис, Н.И. Современные тенденции в конструировании рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы / Н.И. Микшис, О.М. Кудрявцева, В.В. Кутырев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2015. – № 3. – С. 116-126.
73. Микшис, Н.И. Современное состояние проблемы разработки вакцин для специфической профилактики чумы / Н.И. Микшис, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 1. – С. 50-63.

74. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза: МУ 3.3.2.2124-06. – Москва, 2006. – 23 с.
75. Методы контроля бактериологических питательных сред: МУК 4.2.2316-08. – Москва: Роспотребнадзор, 2008. – 67 с.
76. Наумов, А. В. Иммунология чумы / А. В. Наумов, М. Ю. Ледванов, И. Г. Дроздов. – Саратов, 1992. – 172 с.
77. Лиофилизация как способ стабилизации лекарственных препаратов (обзор) / Л.Л. Николаева, И.Д. Гулякин, О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, В.В. Хламов, Н.Д. Бунятян // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – № 4. – С. 54-59.
78. Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение № 4), Приказ № 742 Министерства высшего и среднего специального образования СССР от 13 ноября 1984 г.
79. Иммуномодуляторы и специфическая профилактика инфекционных болезней / Н.Д. Омельченко, И.А. Иванова, И.А. Беспалова, А.В. Филиппенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 3. – С. 21-26.
80. Онищенко, Г.Г. Актуальные проблемы профилактики инфекционных болезней на современном этапе / Г.Г. Онищенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 4. – С. 13-22.
81. ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств»
82. Павлова, Л.П. Внутривенная аллергическая реакция на пестин как показатель иммунитета к чуме: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Л.П. Павлова. – Саратов, 1964. – 16 с.
83. Печников, Н.Е. Оптимизация режимов лиофильного высушивания чумной живой вакцины ЕВ: дис. ...канд. мед. наук : 03.00.07 / Печников Николай Евгеньевич. – Саратов, 1991. – 20 с.
84. Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии / М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич. – СПб.: Элбис-СПб, 2008. – 352 с.

85. Приказ Министерства здравоохранения РФ № 125н от 21.03.2014 г. «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям»
86. Влияние беталейкина на показатели антигенспецифического ответа в модельных опытах иммунизации животных живой чумной вакциной / Т.С. Пономарева, П.Н. Дерябин, Б.В. Каральник, Т.Г. Денисова, Т.И. Тугамбаев, Б.Б. Атшабар, С.Б. Закарян, Н.Н. Мельникова // Цитокины и воспаление. – 2014. – Т. 13, №1. – С. 57-62.
87. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2008–2017 гг. и прогноз на 2018 г. / Н.В. Попов, А.А. Кузнецов, А.Н. Матросов, В.М. Корзун, Д.Б. Вержуцкий, С.А. Вершинин, С.А. Косилко, Т.М. Иннокентьева, М.П. Григорьев, Д.Ю. Дегтярев, Е.В. Герасименко, В.М. Дубянский, М.М. Шилов, В.П. Топорков, Е.С. Зенкевич, В.П. Попов, А.А. Лопатин, В.Е. Безсмертный, С.В. Балахонов, А.Н. Куличенко, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 1. – С. 50-55.
88. Промышленный регламент ПР 01897080-09-16 на производство Вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения и ингаляций. – Ставрополь, 2016. – 252 с.
89. Ракитина, Е.Л. Оптимизация доз чумной вакцины ЕВ по количеству живых микробных клеток: дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Ракитина Екатерина Львовна. – Ставрополь, 1988. – 194 с.
90. Продукция цитокинов клетками крови как показатель напряженности поствакцинального клеточного иммунитета / С.Л. Рыжикова, Ю.Г. Дружинина, Т.Г. Рябичева, М.Ю. Рукавишников, Н.А. Вараксин // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 57-61.
91. Профилактика чумы. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 3.1.7.2492-09. – М., 2009.
92. Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарные правила СП 1.3.3118-13. – М., 2014. – 195 с.

93. СП 3.3.2.3332-16 Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов: санитарно-эпидемиологические правила. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017. – 36 с.
94. Саяпина, Л.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций / Л.В. Саяпина, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 107-110.
95. Старцева, О.Л. Совершенствование биотехнологии производства питательных сред для культивирования чумного микроба на основе сырья животного и растительного происхождения: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.23 / Старцева Ольга Леонидовна. – Ставрополь, 2005. – 21 с.
96. Тараненко, Т.М. Характеристика некоторых аллергенов, предложенных для выявления иммунитета при чуме: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Тараненко Татьяна Михайловна. – Саратов, 1968. – 15 с.
97. Тараненко, Т.М. Углеводсодержащие антигены чумного и псевдотуберкулезного микробов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07 / Тараненко Татьяна Михайловна. – Саратов, 1988. – 41 с.
98. Тараненко, Т.М. Изучение химического состава аллергена пестина ПП. Исследование пестина методом электрофореза / Т.М. Тараненко // Проблемы особо опасных инфекций. – 1968. – № 2. – С. 154-157.
99. Тараненко, Т.М. Получение очищенного аллергена пестина ПП / Т.М. Тараненко, Е.Э. Бахрах // Материалы межинститутской научной конференции памяти Л.А. Тарасевича. – Москва, 1967. – С. 249-250.
100. Патент РФ 2510825 МПК C12N 1/04. Способ получения чумных вакцин / В.В. Тетерин, А.В. Ежов, В.В. Бирюков, Д.А. Мохов, С.В. Багин, А.З. Хонин, С.В. Логвинов ; опубл. 10.04.2014. Бюл. № 10.
101. Тинкер, А.И. Влияние сублимационного (лиофильного) высушивания на штамм ЕВ чумного микроба: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук / А.И. Тинкер, – Ставрополь, 1971. – 38 с.

102. Пути снижения контаминации таблетированной чумной живой вакцины на этапах ее производства / А.С. Туманов, В.В. Тетерин, А.А. Лещенко, А.В. Ежов, В.В. Бирюков, С.В. Багин, Д.А. Мохов, С.В. Логвинов, А.Г. Лазыкин, Д.С. Белобородов, В.Н. Бредихин, И.В. Поздняков / Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 1. – С. 102-105.
103. Узенцов, С.А. Кожная гиперчувствительность и резистентность к чуме при иммунизации различными вакцинными штаммами чумного микроба / С.А. Узенцов, М.В. Зубова // Профилактика особо опасных инфекций. – 1976. – № 1. – С. 101-107.
104. Уша, Б.В. Контроль остатков антибиотиков в сырье и продуктах животного происхождения / Б.В. Уша, О.И. Кальницкая // Ветеринарный врач. – 2009. – № 3. – С. 21-23.
105. Файбич, М.М. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения / М.М. Файбич // Успехи микробиологии. – 1983. – № 18. – С. 193-215.
106. Фармакопейная статья предприятия ФСП 42-8654-07 ЛСР-005759/08-220708 «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения и ингаляций». – 2007. – 7 с.
107. Определение экспрессии маркера ранней активации CD69 на лимфоцитах иммунных мышей после стимуляции их антигенами чумного микроба / В.В. Фирстова, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Е.В. Зырина, С.А. Иванов, Н.В. Киселева, П.Х. Копылов, А.П. Анисимов, И.А. Дятлов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – № 103. – С. 56-59.
108. Фирстова, В.В. Экспериментально-иммунологическое обоснование выбора стратегии оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляриемии: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 14.03.09 / Фирстова Виктория Валерьевна. – Оболенск, 2015. – 49 с.
109. Оценка специфического гуморального и клеточного иммунитета у людей периодически вакцинирующихся против чумы / В.В. Фирстова, О.В.

- Калмантаева О.В., А.А. Горбатов, Т.Б. Кравченко, Е.А. Тюрин, Н.Л. Бондаренко, И.А. Дятлов, А.В. Караулов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2015. – № 3. – С. 62-68.
110. Фирстова, В.В. Современные направления разработок противочумных вакцин / В.В. Фирстова, А.В. Караулов, И.А. Дятлов // Иммунология. – 2017. – № 2. – С. 100-105.
111. Хаитов, Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы: учебное пособие. - Москва, 2013. – 280 с.
112. Хайдуков, С.В. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров–анализаторов» (проект) / С.В. Хайдуков, Л.А. Байдун, А.В. Зурочка // Медицинская иммунология. – 2012. – № 3. – С. 255-268.
113. Возможность использования питательных сред из кукурузного экстракта в производстве чумной живой сухой вакцины ЕВ / Э.А. Чернова, А.И. Тинкер, К.С. Гюлушанян, Н.Е. Печников, Г.С. Новицкая, Г.Н. Верховцева В.Д. Майская, Н. А. Саркисян // Особо опасные инфекции на Кавказе: тез. докладов VI науч. конф. декабрь 1987 г. – Ставрополь, 1987. – Ч.2. – С. 145-148.
114. Оптимизация процесса концентрирования микробных клеток в технологии чумных вакцин / Д.А. Шаров, А.А. Лещенко, С.В. Багин, Д.А. Мохов, С.В. Логвинов, В.В. Крупин, А.В. Ежов, А.Г. Лазыкин, В.В. Бирюков // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2019. – № 1 – С. 50-55.
115. Поверхностная экспрессия CD25 у лимфоцитов человека на разных стадиях запуска пролиферативного ответа. II. Действие интерлейкина-2 / А.Н. Шатрова, В.В. Зенин, Н.Д. Аксенов, Е.В. Митюшова, И.И. Марахова // Цитология. – 2011. – № 8. – С. 652-658.
116. Шепелин, А.П. Современное состояние и тенденции в разработке, производстве и применении питательных сред / А.П. Шепелин // Бактериология. – 2016. – № 1. С. 42-47.

117. Шмелькова, Т.П. Взаимодействие чумного микроба и его антигенов с клетками крови человека *in vitro*: автореф. дис. канд. биол. наук : 03.00.07, 14.00.36 / Шмелькова Татьяна Петровна. – Саратов, 2008. – 26 с.
118. Индуцированная продукция IFN- γ и IL-4 как показатель функциональной активности Th1- и Th2-клеток у вакцинированных против чумы людей / Т.Н. Щуковская, Е.А. Смолькова, Т.П. Шмелькова, С.Н. Ключева, С.А. Бугоркова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2011. – № 6(61). – С. 78-83.
119. Binding of LcrV protein from *Yersinia pestis* to human T-cells induces apoptosis, which is completely blocked by specific antibodies / V. Abramov, I. Kosarev, V. Motin, V. Khlebnikov, R. Vasilenko, V. Sakulin, A. Machulin, V. Uversky, A. Karlyshev // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. - Vol. 120. – P. 62-70.
120. Critical Assessment of Automated Flow Cytometry Data Analysis Techniques / N. Aghaeepour, G. Finak, H. Hoos, T.R. Mosmann, R. Brinkman, R. Gottardo // Nat Methods. – 2013. – № 10. – P. 228-238.
121. Identification of New Virulence Factors and Vaccine Candidates for *Yersinia pestis* / J.A. Andersson, J. Sha, T.E. Erova, E.C. Fitts, D. Ponnusamy, E.V. Kozlova, M.L. Kirtley, A.K. Chopra // Front Cell Infect. Microbiol. – 2017. – Vol. 7. – P. 1-16.
122. On the ontogeny and physiology of regulatory T cells / O. Annacker, R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, A. Bandeira // Immunol. Rev. – 2001. – Vol. 182. – P. 5-17.
123. Role of immune response in *Yersinia pestis* infection / A. Amedei, E. Niccolai, L. Marino, M. D'Elia // J. Infect. Dev. Ctries. – 2011. - Vol. 5, № 9. – P. 28-39.
124. Oral vaccination against bubonic plague using a live avirulent *Yersinia pseudotuberculosis* strain / T. Blisnick, P. Ave, M. Huerre, E. Carniel, C.E. Demeure // Infect. Immun. – 2008. – Vol. 76, № 8. – P. 8-16.
125. Castiblanco, J. Genetics and vaccines in the era of personalized medicine / J. Castiblanco, J.M. Anaya // Curr. Genomics. 2015. – Vol. 16, № 1. – P. 47-59.
126. Immunogenicity and safety of subunit plague vaccine: A randomized phase 2a clinical trial / K. Chu, J. Hu, F. Meng, J. Li, L. Luo, J. Xu, Z. Yuan, Z. Li, W. Chen,

- L. Jiao, Y. Chang, B. Wang, Y. Hu // *Vaccin. Immunother.* – 2016. – Vol. 12, № 9. – P. 2334-2340.
127. Invasion of epithelial cells by *Yersinia pestis*: evidence for a *Y. pestis* specific invasion / C. Cowan, H.A. Jones, Y.H. Kaya, R.D. Perry, S.C. Straley // *Infect Immun.* – 2000. – Vol. 68, № 9. – P. 4523-4530.
128. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells / K. Dabbagh, M.E. Dahl, P. Stepick-Biek, D.B. Lewis // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168, N 452. – P. 4-7.
129. Humoral and cellular immune correlates of protection against bubonic plague by a live *Yersinia pseudotuberculosis* vaccine / C.E. Demeure, A. Derbise, C. Guillas, C. Gerke, S. Cauchemez, E. Carniel, J. Pizarro-Cerdá // *Vaccine.* – 2019. – Vol. 37, N 1 – P. 123-129.
130. Influence of human recombinant interleukin-1beta on protective and immunogenic efficacy of live plague vaccine / P. Deryabin, T. Ponomaryova, B. Karalnik, T. Tugambayev, T. Denisova, B. Atshabar, S. Zakaryan, N. Melnikova // *Medical and Health Science Journal.* – 2014. – Vol. 15, N 1. – P. 27-34.
131. Induction of pulmonary mucosal immune responses with a protein vaccine targeted to the DEC-205/CD205 receptor // Y. Do, A.M. Didierlaurent, S. Ryu, H. Koh, C.G. Park, S. Park, D.S. Perlin, B.S. Powell, R.M. Steinman // *Vaccine.* – 2012. – Vol. 30, N 45 – P. 6359-6367.
132. Elvin, S.J. Stat 4 but not Stat 6 mediated immune mechanisms are essential in protection against plague / S.J. Elvin, E.D. Williamson // *Microb. Pathog.* 2004. – Vol. 37. – P. 177-184.
133. Characterization of a Cynomolgus Macaque Model of Pneumonic Plague for Evaluation of Vaccine Efficacy / P. Fellows, J. Price, S. Martin, K. Metcalfe, R. Krile, R. Barnewall, M. Hart, H. Lockman // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2015. – Vol. 22, N 9 – P. 1070-1078.
134. Immunological Markers that Correlate with Protection Immunity Against Tularemia Infection / V.V. Firstova, A.N. Mokrievich, V.M. Pavlov, A.A. Gorbatov,

- S.F. Biketov, I.A. Dyatlov // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2014. – № 808. – P. 15-23.
135. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4 T cell survival / A.E. Gelman, J. Zhang, Y. Choi, L.A. Turka // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172, N 10. – P. 6065-6073.
136. Polymorphism in clinical immunology – From HLA typing to immunogenetic profiling / P. Jin, E. Wang // *J. Translat.* – 2003. – № 8. – P. 8-19.
137. Protection against pneumonic plague following oral immunization with a non-replicating vaccine / A. Jones, C. Bosio, A. Duffy, A. Goodyear, M. Schriefer, S. Dow // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28, N 36. – P. 5924-5929.
138. Kevin R. Ward *Lyophilization of pharmaceuticals and biologicals: New Technologies and Approaches* / Kevin R. Ward, Edited by Paul Matejtschuk. – Springer, 2019. – 382.
139. Khan, A.A. Cell-mediated immune response and Th1/Th2 cytokine profile of B-T constructs of F1 and V antigen of *Yersinia pestis* / A.A. Khan, D.N. Rao // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 71, N 3. – P. 186-198.
140. T cells play an essential role in anti-F1 mediated rapid protection against bubonic plague / Y. Levy, Y. Flashner, A. Tidhar, A. Zauberman, M. Aftalion, S. Lazar, D. Gur, A. Shafferman, E. Mamroud // *Vaccine*. 2011. – Vol. 29, № 40. – P. 6866-6873.
141. Levy, O. Innate immune memory: implications for development of pediatric immunomodulatory agents and adjuvanted vaccines / O. Levy, M.G. Netea // *Pediatric Researches*. – 2014. – Vol. 75, N 6. – P. 184-188.
142. Li, B. Interaction between *Yersinia pestis* and the host immune system / B. Li, R. Yang // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76, № 5. – P. 1804-1811.
143. Humoral and Cellular Immune Responses to *Yersinia pestis* Infection in Long-Term Recovered Plague Patients / B. Li, C. Du, L. Zhou, Y. Bi, X. Wang, L. Wen, Z. Guo, Z. Song, R. Yang // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2012. – Vol. 19, N 2. – P. 228-234.

144. Immunization of mice with YscF provides protection from *Yersinia pestis* infections / J.S. Matson, K.A. Durick, D.S. Bradley, M.L. Nilles // BMC Microbiol. – 2005. – Vol. 24, N 5. – P. 38.
145. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates / S. Mizel, A. Graff, N. Sriranganathan, S. Ervin, C. Lees, M. Lively, R. Hantgan, M. Thomas, J. Wood, B. Bell // Clin. Vaccine Immunol. – 2009. – Vol. 16, N 1. – P. 21-28.
146. Repertoire of HLA-DR1-restricted CD4 T-cell responses to capsular Caf1 antigen of *Yersinia pestis* in human leukocyte antigen transgenic mice / J.A. Musson, R. Ingram, G. Durand, S. Ascough, E.L. Waters, M.G. Hartley, T. Robson, B. Maillere, E.D. Williamson, S. Sriskandan, D. Altmann, J.H. Robinson // Infect Immun. – 2010. – Vol. 78, N 10. – P. 4356-4362.
147. Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense / M.G. Netea, E. Latz, Kingston H.G. Mills, Luke A.J. O'Neill // Nature immunology. 2015. – Vol. 16, N 7. – P. 675-679.
148. Ovsyannikova, I.G. Vaccinomics: current findings, challenges and novel approaches for vaccine development / I.G. Ovsyannikova, G.A. Poland // AAPS J. – 2011. – Vol. 13, N 3. – P. 4384-444.
149. A *Yersinia pestis* guaBA mutant is attenuated in virulence and provides protection against plague in a mouse model of infection / P.C. Oyston, G. Mellado-Sanchez, M.F. Pasetti, J.P. Nataro, R.W. Titball, H.S. Atkins // Microb. Pathog. – 2010. – Vol. 48, N 5. – P. 191-195.
150. Cell-mediated protection against pulmonary *Yersinia pestis* infection / M.A. Parent, K.N. Berggren, L.W. Kummer, L.B. Wilhelm, F.M. Szaba, I.K. Mullarky, S.T. Smiley // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73. – P. 7304-7310.
151. Philipovskiy, A.V. Vaccination with Live *Yersinia pestis* Primes CD4 and CD8 T Cells That Synergistically Protect against Lethal Pulmonary *Y. pestis* Infection / A.V. Philipovskiy, S.T. Smiley // Infection and Immunity. – 2007. – Vol. 75, N 2. – P. 878-885.

152. The role of mass spectrometry in vaccine development / J.A. Poland, I.G. Ovsyannikova, K.L. Johnson, S. Naylor // *Vaccine*. – 2001. – Vol. 19, N 17-19. – P. 2692-2700.
153. Preclinical safety assessment of a recombinant plague vaccine (rF1V) / J.L. Price, T.S. Manetz, J.D. Shearer, R.V. House // *Int. J. Toxicol.* – 2013. – Vol. 32, N 5. – P. 327-335.
154. Pulendran, B. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development / B. Pulendran, R. Ahmed // *Cell*. – 2006. – Vol. 124, N 5. – P. 849-863.
155. Rajan, T.V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation / T.V. Rajan // *Trends Immunol.* 2003. – Vol. 24, N 7. – P. 376-379.
156. Robinson, V.L. A dam mutant of *Yersinia pestis* is attenuated and induces protection against plague / V.L. Robinson, P.C. Oyston, R.W. Titball // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2005. – Vol. 252, N 2. – P. 251-256.
157. Progress on plague vaccine development / J.A. Rosenzweig, O. Jejelowo, J. Sha, T.E. Erova // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 91. – P. 265-286.
158. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self // S. Sakaguchi // *J. Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6, N 4. – P. 345-352.
159. Shipkova, M. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation / M. Shipkova, E. Wieland // *Clinica Chimica Acta*. – 2012. – Vol. 413. – P. 1338-1349.
160. Fast and simple detection of *Yersinia pestis* applicable to field investigation of Plague Foci / S. Simon, C. Demeure, P. Lamourette, S. Filali, M. Plaisance, C. Créminon, H. Volland, E. Carniel // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, N 1. – P. e54947.
161. Sokhey, S.S. Hydrolisate of casein for preparation of plague and cholera vaccines / S.S. Sokhey, M.K. Harbu, K.F. Bharucha // *Bull. WHO*. 1950. – Vol. 3. – P. 25-31.
162. Sun, W. Developing live vaccines against plague // W. Sun, K. Roland, R. Curtiss // *J. Infect. Dev. Ctries.* – 2011. – Vol. 5. – P. 614-627.

163. Sun, W. Plague Vaccines: Status and Future / W. Sun // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2016. – Vol. 918. – P. 313-360.
164. Titball, R.W. *Yersinia pestis* (plague) vaccines / R.W. Titball, E.D. Williamson // *Expert Opin Biol Ther.* – 2004. – Vol. 4, N 6. – P. 965-73.
165. Humoral immune responses and protective efficacy of sequential B- and T-cell epitopes of V antigen of *Yersinia pestis* by intranasal immunization in microparticles / J.B. Uppada, A.A. Khan, A.A. Bhat, R. Deshmukh, D.N. Rao // *Med. Microbiol. Immunol.* – 2009. – Vol. 198, N 4. – P. 247-256.
166. Verma, S. Recombinant Trivalent Fusion Protein F1-LcrV-HSP70(II) Augments Humoral and Cellular Immune Responses and Imparts Full Protection against *Yersinia pestis* / S. Verma, U. Tuteja // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 1053.
167. Verma, S. Plague Vaccine Development: Current Research and Future Trends / S. Verma, U. Tuteja // *Front. Immunol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 602.
168. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and rV antigens / E. Williamson, H. Flick-Smith, C. LeButt, C. Rowland, S. Jones, E. Waters, R. Gwyther, J. Miller, P. Packer, M. Irving // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73, N 6. – P. 3598-3608.
169. Recombinant (F1+V) vaccine protects cynomolgus macaques against pneumonic plague / E. Williamson, P. Packer, E. Waters, A. Simpson, D. Dyer, J. Hartings, N. Twenhafel, M. Pitt // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29(29–30). – P. 4771-4777.
170. Williamson, E. Protecting against plague: towards a next-generation vaccine / E. Williamson, P. Oyston // *Clin. Exp. Immunol.* – 2013. – Vol. 172, N 1. – P. 1-8.
171. Yang, R. Plague: Recognition, Treatment and Prevention / R. Yang // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2018. – Vol. 56, N 1. – P. 1517-1519.
172. Zhou, D. Molecular and physiological in-sights into plague transmission, virulence and etiology / D. Zhou, Y. Han, R. Yang // *Microbes Infect.* – 2006. – Vol. 8, N 1. – P. 273-284.

173. Novel CTL epitopes identified through a *Y. pestis* proteome-wide analysis in the search for vaccine candidates against plague / A. Zvi, S. Rotem, A. Zaubergerman, U. Elia, M. Aftalion, E. Bar-Haim, E. Mamroud, O. Cohen // Vaccine 2017. – Vol. 35, N 44. – P. 5995-6006.

СПИСОК НАУЧНЫХ 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 научно-практической конференции 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. научно-практич. 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 международ. 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 научно-практической конференции «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 научно-практической конференции «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 научно-практической конференции «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.

Приложение А

Питательная среда плотная для культивирования и сбора биомассы чумного микроба вакцинного штамма *Y. pestis* EV

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2626568

Питательная среда плотная для культивирования и сбора биомассы чумного микроба вакцинного штамма *Y. pestis* EV

Патентообладатель: *Федеральное казённое учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2016123661

Приоритет изобретения 14 июня 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

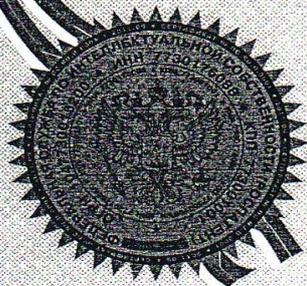
Российской Федерации 28 июля 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 14 июня 2036 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев



Приложение Б

Способ оценки иммуногенности вакцины чумной живой с использованием антигенспецифических клеточных тестов *in vitro*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2680697

**СПОСОБ ОЦЕНКИ ИММУНОГЕННОСТИ ВАКЦИНЫ
ЧУМНОЙ ЖИВОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТОВ
IN VITRO**

Патентообладатель: *Федеральное казённое учреждение здравоохранения "Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека" (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2018106216

Приоритет изобретения 19 февраля 2018 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 25 февраля 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 19 февраля 2038 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ивлиев



Приложение В

Способ применения комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба для оценки уровня противочумного иммунитета

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2725872

Способ применения комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба для оценки уровня противочумного иммунитета

Патентообладатель: *Федеральное казённое учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (РУ)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2019124602

Приоритет изобретения 30 июля 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 07 июля 2020 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 30 июля 2039 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ильин

